

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

LETÍCIA BORGES DE ANDRADE

Efeito da suplementação de simbióticos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em modelos animais de esteatose hepática não alcoólica

RIBEIRÃO PRETO

2023

LETÍCIA BORGES DE ANDRADE

Efeito da suplementação de simbióticos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em modelos animais de esteatose hepática não alcoólica

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Letícia Borges de

Efeito da suplementação de simbióticos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em modelos animais de esteatose hepática não alcoólica.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

Versão Original

1. Simbióticos. 2. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. 3. Estresse Oxidativo. 4. Modulação Intestinal.

Nome: ANDRADE, Letícia Borges de

Título: Efeito da suplementação de simbióticos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em modelos animais de esteatose hepática não alcoólica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, meu orientador, amigos e noivo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, desafios e caminhos a mim entregues. Por me iluminar e guiar em todos os momentos de alegria, fragilidade, tristeza, ansiedade e dificuldades, e por me amparar e não me deixar desistir. Por me proporcionar sabedoria, compreensão, paciência e luz.

Ao orientador Prof. Dr. Alceu, pela oportunidade, pela confiança, conselhos e todo conhecimento entregues ao longo desses anos, contribuindo para meu crescimento pessoal, profissional e científico.

À técnica de laboratório Paula Payão, pela atenção, apoio, companheirismo.

À Prof. Rejane Maira Goes e ao seu aluno de pós-graduação Gustavo Matheus Amaro, pelo apoio, parceria e paciência.

Ao apoio técnico do biotério Roni Charles, pela atenção e apoio em todo o período experimental.

Aos meus pais, que durante todos esses anos me apoiaram, ajudaram, confiaram e me aconselharam em todos os meus sonhos e escolhas. Obrigada por todo incentivo e por acreditarem no meu potencial, e por comemorarem cada passo e cada conquista.

Agradeço à toda a minha família e amigos, que me apoiaram, me ouviram e me incentivaram nos momentos difíceis.

Ao meu noivo, pela paciência, atenção, carinho e apoio.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação por todo apoio e atenção.

À secretaria de pós-graduação em clínica médica, principalmente ao secretário Emerson Quirino de Oliveira, pelo apoio, atenção e paciência.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

RESUMO

ANDRADE, L. B. **Efeito da suplementação de simbióticos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em modelos animais de esteatose hepática não alcoólica.** 2023. 39 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

A esteatose hepática não alcoólica está relacionada à uma das causas mais comuns de doenças hepáticas e morbidade. Sua incidência tem sido relacionada ao consumo excessivo de dietas ricas em carboidratos e gorduras, à obesidade e comorbidades relacionadas. Dessa forma há grande interesse na pesquisa pela modulação de dietas afim de promover a prevenção, atenuar o dano hepático, melhorar a função hepática e reduzir sua progressão. Neste trabalho foram utilizados 60 camundongos C57BL que foram divididos em 6 grupos: Grupo Controle (n=10) que recebeu dieta controle baseada na dieta AIN-93 para alimentação de roedores; Grupo controle + simbiótico A (n=10) que recebeu dieta controle baseada na AIN-93 e simbiótico; Grupo Controle + simbiótico B (n=10) que recebeu dieta controle baseada na AIN-93 e simbiótico com micronutrientes; Grupo Hiperlipídica + Frutose (n=10) que recebeu dieta hiperlipídica rica em frutose baseada na AIN-93; Grupo hiperlipídica / frutose + simbiótico A (n=10) que recebeu dieta hiperlipídica rica em frutose baseada na AIN-93 e simbiótico; Grupo hiperlipídica / frutose + simbiótico B (n=10) que recebeu dieta hiperlipídica rica em frutose baseada na AIN-93 e simbiótico com micronutrientes. Após 16 semanas experimentais os animais foram eutanasiados para coleta do sangue e tecidos para a realização das análises bioquímicas e histológicas. A oferta de uma dieta hiperlipídica rica em frutose ocasionou um maior ganho de peso no grupo HLF, enquanto o grupo CT e os grupos que receberam suplementação de simbióticos foram eficazes em retardar o ganho de peso. Quanto ao peso dos tecidos, não houve diferenças significativas em relação ao peso dos rins direito e esquerdo, tecido adiposo retroperitoneal e tecido intestinal. Em relação ao peso do tecido adiposo epididimal os grupos CT/B e HLF/A apresentaram aumento em comparação aos demais grupos. A quantificação de gordura hepática mostrou um maior acúmulo de gordura hepática no grupo HLF. Não houve diferenças quanto à dosagem de colesterol total. Em relação à glicemia, os grupos CT/A e CT/B apresentaram um maior índice glicêmico em comparação aos grupos que receberam dieta hiperlipídica. A peroxidação lipídica avaliada através do MDA hepático mostrou um aumento no grupo HLF/B em relação aos demais grupos. Em relação aos parâmetros antioxidantes, os grupos HLF/A e HLF/B apresentaram GSH elevado em comparação aos demais grupos. Para vitamina E, houve diferenças significativas entre os grupos HLF, HLF/A e HLF/B em relação aos grupos CT, CT/A, CT/B. Para as concentrações séricas de ALT não houve diferença entre os grupos. Sendo assim, a suplementação de simbióticos provocou diferentes impactos em diferentes mecanismos fisiológicos, se mostrando eficiente na prevenção de NAFLD e na diminuição do ganho de peso. Dessa forma, a suplementação combinada de simbiótico e nutrientes, parece ser uma alternativa para a prevenção e tratamento de esteatose hepática não alcoólica, em dietas ricas em gorduras e carboidratos.

Palavras-chave: simbióticos, estresse oxidativo, modulação intestinal, DHGNA.

ABSTRACT

ANDRADE, L. B. **Effect of symbiotic supplementation on lipid metabolism and oxidative stress in animal models of non-alcoholic hepatic steatosis.** 2023. 39 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Non-alcoholic fatty liver disease is linked to one of the most common causes of liver disease and morbidity. Their incidence has been related to excessive consumption of diets rich in carbohydrates and fats, obesity and related comorbidities. Thus, there is great interest in research for the modulation of diets in order to promote prevention, attenuate liver damage, improve liver function and reduce its progression. In this work, 60 C57BL mice were divided into 6 groups: Control Group (n=10) that received a control diet based on the AIN-93 diet for rodent feeding; Control group + symbiotic A (n=10) that received a control diet based on AIN-93 and symbiotic; Control Group + symbiotic B (n=10) that received a control diet based on AIN-93 and symbiotic with micronutrients; Hyperlipidic + Fructose Group (n=10) that received a high-fat diet rich in fructose based on AIN-93; High-fat / fructose + symbiotic group A (n=10) that received a high-fat high-fructose diet based on AIN-93 and symbiotic; High-fat / fructose + symbiotic B group (n=10) that received a high-fat diet rich in fructose based on AIN-93 and symbiotic with micronutrients. After 16 experimental weeks, the animals were euthanized for blood and tissue collection to perform biochemical and histological analyses. The offer of a high-fat diet rich in fructose caused a greater weight gain in the HLF group, while the CT group and the groups that received symbiotic supplementation were effective in delaying weight gain. As for the weight of the tissues, there were no significant differences in relation to the weight of the right and left kidneys, retroperitoneal adipose tissue and intestinal tissue. Regarding the weight of the epididymal adipose tissue, the CT/B and HLF/A groups showed an increase compared to the other groups. The quantification of hepatic fat showed a greater accumulation of hepatic fat in the HLF group. There were no differences regarding total cholesterol levels. Regarding blood glucose, the CT/A and CT/B groups had a higher glycemic index compared to the groups that received a high-fat diet. The lipid peroxidation evaluated through the hepatic MDA showed an increase in the HLF/B group in relation to the other groups. Regarding the antioxidant parameters, the HLF/A and HLF/B groups presented high GSH compared to the other groups. For vitamin E, there were significant differences between the HLF, HLF/A and HLF/B groups compared to the CT, CT/A, CT/B groups. There was no difference between groups for serum ALT concentrations. Thus, symbiotic supplementation caused different impacts on different physiological mechanisms, proving to be efficient in preventing NAFLD and reducing weight gain. Thus, the combined supplementation of symbiotic and nutrients seems to be an alternative for the prevention and treatment of non-alcoholic hepatic steatosis, in diets rich in fats and carbohydrates.

Keywords: symbiotics, oxidative stress, intestinal modulation, NAFLD.

LISTA DE FIGURAS

Fig.	Título	Pg.
01	Ganho de peso total dos grupos ao final das 16 semanas experimentais (g)	24
02	Ingestão alimentar ao longo do período experimental (g)	25
03	Gordura hepática total, colesterol total e triglicerídeos hepáticos	27
04	Valores médios de glicemia	28
05	Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E	29
06	Valores séricos de GSH	30
07	Concentrações médias de TGO e TGP	31
08	Microfotografias mostrando aspectos histológico do tecido hepático de animais dos grupos CT, CT/A, CT/B, HLF, HLF/A e HLF/B	32

LISTA DE TABELAS

Tab.	Título	Pg.
01	Composição das dietas experimentais (100 g)	18
02	Composição dos simbióticos utilizados (1000 g)	19
03	Média de ingestão alimentar e energético diárias	25
04	Peso dos tecidos rim direito, rim esquerdo, adiposo epididimal e retroperitoneal e intestinal (g)	26
05	Gordura hepática total, colesterol total e triglicérides	26
06	Relação Vitamina E / MDA e GSH / MDA	29
07	Avaliação do score de esteatose hepática não alcoólica	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

EHNA – Esteatohepatite não alcoólica

RI – Resistência à insulina

H&E – Hematoxilina eosina

MDA – Malondialdeído

GSH – Glutationa Reduzida

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CT – Grupo controle

CT/A – Grupo controle com simbiótico A

CT/B – Grupo controle com simbiótico B

HLF – Grupo hiperlipídica frutose

HLF/A – Grupo hiperlipídica frutose com simbiótico A

HLF/B – Grupo hiperlipídica frutose com simbiótico B

TG's – Triacilgliceróis

TGO – Transaminase glutâmico-oxaloacética

TGP – Transaminase glutâmico-pirúvica

FOS - Frutooligossacarídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1	Análises histopatológicas do fígado e parâmetros hepáticos	20
2.2	Quantificação de gordura hepática total	20
2.3	Determinação da peroxidação lipídica hepática	21
2.4	Determinação de glutathiona reduzida (GSH) hepática e sérica	21
2.5	Determinação das transaminases aspartato aminotransferase (ALT) e alanina aminotransferase (AST)	22
2.6	Determinação de Vitamina E hepática	22
2.7	Determinação da glicemia	23
2.8	Análise estatística	23
3	RESULTADOS	23
3.1	Peso dos animais	23
3.2	Ingestão alimentar	24
3.3	Peso dos tecidos	25
3.4	Gordura hepática total, triglicerídeos e colesterol hepáticos	26
3.5	Glicemia	27
3.6	Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo	28
3.7	Concentrações séricas das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)	30
3.8	Histologia Hepática	31
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÕES	37
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	38
7	BIBLIOGRAFIA	39

1. INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) ou esteatose hepática não alcoólica, vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública e uma das causas mais comuns de doença hepática crônica. Evidências mostram que a DHGNA é a doença global que mais cresce, contribuindo para a rápida progressão e complicações, como cirrose e hepatocarcinoma (GOLAB, P., et al., 2021; PAIK, J. M., et al., 2020). Além disso, dados recentes da Rede Unida para o Compartilhamento de Órgãos (UNOS) mostra que a DHGNA é a segunda indicação para transplante de órgãos e tem se tornado a principal indicação para transplante de fígado (YOUNOSSI, Z. M., et al., 2021). Estudos recentes apontam que a prevalência global de DHGNA seja de 30,05%, com maior prevalência na América Latina (44,4%), Oriente Médio e Norte Africano (36,5%), Sul Asiático (33,8%), Sudeste Asiático (33,07%), América do Norte e Austrália (31,2%), Leste Asiático (29,7%), Pacífico Asiático (28,02%) e Europa Ocidental (25,1%) (YOUNOSSI, Z. M., et al., 2023). No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Hepatologia, em torno de 20% da população geral possui DHGNA.

A DHGNA é causada pelo acúmulo de triacilglicerol em indivíduos sem ingestão excessiva de álcool (consumo superior a 10 g de etanol por dia) (CASTRO, S. G.; CALDER, C. P., 2018; LU, Q., et al., 2021). A DHGNA, na maior parte dos indivíduos afetados, é assintomática e está associada à obesidade e às manifestações da síndrome metabólica, como hipertensão, dislipidemia, adiposidade central e resistência à insulina ou diabetes tipo 2 (FORLANO, R., et al., 2023). Além disso, a DHGNA pode se tornar progressiva e evoluir de esteatose simples com acúmulo de gordura hepática para EHNA (esteatohepatite não alcoólica), fibrose, cirrose e carcinoma (MUNDI, M.S. et al, 2020; POWELL, E. E., WONG, V. W. S., RINELLA, M., 2021).

Buzzetti E., Pinzani M. e Tsochatzis E. A. (2015), propuseram e delinearão a hipótese “multiple hits”, onde fatores dietéticos e ambientais, juntamente com a obesidade, levam a níveis séricos elevados de ácidos graxos livres e colesterol, desenvolvimento de resistência à insulina, proliferação e disfunção de adipócitos e alterações na microbiota intestinal.

Os ácidos graxos são entregues principalmente ao fígado através da corrente sanguínea após a lipólise dos triglicerídeos no tecido adiposo, processo que é regulado pela ação da insulina nos adipócitos. Sendo assim, a sinalização pós-receptora prejudicada pela insulina, ou seja, resistência à insulina (RI) no tecido adiposo, contribui para a progressão e evolução da esteatose hepática não alcoólica, por meio da lipólise desregulada, resultando no depósito excessivo de ácidos graxos ao fígado (FRIEDMAN, S.L., et al, 2018). No fígado, a resistência à insulina resulta em aumento da lipogênese hepática de novo e inibição prejudicada da lipólise do tecido adiposo, com consequente aumento do fluxo de ácidos graxos neste órgão. Além disso, a resistência à insulina promove disfunção do tecido adiposo resultando em alteração na produção e secreção de adipocitocinas e citocinas inflamatórias (GUILHERME, A., et al, 2008). Dessa forma, a gordura se acumula no fígado na forma de triacilglicerol, ocorrendo simultaneamente com o aumento da lipotoxicidade de altos níveis de ácidos graxos livres, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos.

Como consequência, passa-se a observar uma disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de mecanismos associados ao estresse do retículo endoplasmático (CUSI, K., 2009). Além disso, a microbiota intestinal alterada leva ao aumento da produção de ácidos graxos, aumento da permeabilidade do intestino delgado e, consequente aumento da absorção de ácidos graxos, contribuindo assim na ativação de processos inflamatórios e liberação de citocinas pró inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (KIRPICH, I. A., MARSANO, L. S., MCCLAIN, C. J., 2015). Fatores genéticos ou modificações epigenéticas afetam o conteúdo de gordura dos hepatócitos, os processos enzimáticos e o ambiente inflamatório hepático. Sendo assim, todos esses fatores influenciam e aumentam o risco de progressão para inflamação e fibrose (EHNA) ou persistência em estágio estável da doença (DHGNA) (BUZZETTI, E., PINZANI, M., TSOCHATZIS, E. A., 2015).

Estudos mostram o papel da dieta na fisiopatologia, desenvolvimento e progressão da DHGNA, tanto pela alta ingestão calórica quanto pela qualidade da dieta, excessiva ingestão de nutrientes específicos, como carboidratos (principalmente mono e dissacarídeos) e gorduras (ODDY, W.H., et al., 2013; ASRIH; ORNAYVAZ, 2014).

O consumo excessivo de bebidas adoçadas que contenham ingredientes com alto teor de frutose, como sacarose e xarope de milho, está associado ao aumento do desenvolvimento de esteatose e NASH, principalmente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade (MA, J., et al, 2015). A frutose é considerada um fator dietético pró-inflamatório que resulta em estresse oxidativo e regulação positiva de TNF- α . É eliminado pelo fígado e sua metabolização não depende da ação da insulina, gerando substratos para a lipogênese da via “*de novo*” (MOORE, J. B., GUNN, P. J., FIELDING, B. A., 2014).

O microbioma intestinal desempenha papel fundamental no eixo intestino-fígado, e está relacionado a patogênese e progressão da DHGNA. A microbiota intestinal alterada, ou seja, disbiose intestinal, impacta no balanço energético do hospedeiro pela fermentação de carboidratos (amido resistente e polissacarídeos não amiláceos) em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato, que são absorvidos pelo epitélio intestinal. (TOPPING, D. L., CLIFTON, P. M., 2001). Além disso, a disbiose pode causar aumento da atividade da lipoproteína lipase e consequente aumento do acúmulo de triglicerídeos (TILG, H., MOSCHEN, A.R., 2010).

Os prebióticos são definidos como compostos alimentares de origem vegetal, não digeríveis, constituídos principalmente por polissacarídeos não amidos e oligossacarídeos (LAMBERT, et al., 2015). Os prebióticos são metabolizados por microrganismos intestinais, que modulam a microbiota intestinal, oferecendo benefícios ao hospedeiro (VALCHEVA, R., DIELEMAN, L., A., 2016). Estudos recentes demonstram uma possível prevenção e melhora na DHGNA e EHNA associado ao consumo de frutooligossacarídeos (FOS), e consequente aumento da produção de AGCC – metabólito produzido pelas bactérias intestinais – melhorando assim a disbiose intestinal e função da barreira intestinal (DUARTE, S. M., STEFANO, J. T., OLIVEIRA, C. P., 2019). Além disso, a administração de FOS pode regular o acúmulo de lipídios no fígado, inibir o acúmulo de gordura no tecido adiposo, promover o metabolismo de lipídios e glicose no fígado, melhorar a sensibilidade à insulina e diminuir a expressão de marcadores pró-inflamatórios (MUNTEANU, C., SCHWARTZ, B., 2023). Estudos classificam os prebióticos como alimentos funcionais, devido ao papel na prevenção de doenças e promoção de saúde (PRECUP, G., et al., 2022).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os probióticos são definidos como organismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (MORELLI, L., CAPURSO, L., 2012). Estudos mostram que os probióticos possuem efeitos benéficos para humanos e animais promovendo a motilidade do trato gastrointestinal, restauração da microbiota intestinal e favorecem a proliferação e diferenciação celular epitelial, reforçando a barreira intestinal (AERON, G., MORYA, S., 2017). Além disso, possui papel terapêutico, com benefícios ao sistema imunológico, nervoso e gastrointestinal e prevenção de doenças como obesidade, diabetes, distúrbios cardiovasculares, hepáticos e metabólicos (AZAD, M. A. K., SARKER, M., YIN, J., 2018).

A prevenção ou tratamento da DHGNA consiste em alterações no estilo de vida, alimentação e prática de atividade física, visando perda de peso quando necessário e melhora da resistência à insulina. Prebióticos e probióticos, em conjunto simbióticos, possuem funções fisiológicas que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal, restauração da microflora, manutenção de peso corporal e controle de fatores de risco associados à doença hepática gordurosa não alcoólica (KOBLYIAK N., et al, 2016). Assim, a modificação da flora bacteriana intestinal por simbióticos específicos têm sido propostas como uma abordagem terapêutica para o tratamento e / ou prevenção da DHGNA (SAVCHENIUK O., et al, 2014).

Sendo assim, o presente estudo testou a hipótese de que a modulação da microbiota intestinal com uso de simbióticos numa dieta hiperlipídica pode melhorar a progressão da esteatose hepática não alcoólica, diminuir o estresse oxidativo e os parâmetros da síndrome metabólica em camundongos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 112/2020. O desenvolvimento do projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Foram utilizados 60 camundongos C57/bl com peso inicial aproximado de 20 g na qual foram mantidos em alojamento climatizado no biotério do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com livre acesso a água e ração, e submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra e temperatura mantida a $24 \pm 2^\circ \text{C}$, por 16 semanas.

Os animais foram separados em 6 grupos de acordo com delineamento experimental:

1. Grupo Controle (CT, n=10): dieta AIN-93.
2. Grupo Controle + Simbiótico (CT/A, n=10): dieta AIN-93 e 2% de simbiótico A.
3. Grupo Controle + Simbiótico rico em vitaminas e micronutrientes (CT/B, n=10): dieta AIN-93 e 2% de simbiótico B.
4. Grupo Controle Hiperlipídica + Frutose (HLF, n=10): Dieta hiperlipídica + Frutose (50 % banha de porco e 20% frutose) baseada na dieta AIN-93.
5. Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico (HLF/A, n=10): Dieta hiperlipídica + Frutose (50 % banha de porco e 20% frutose) baseada na dieta AIN-93 e 2% de simbiótico A.
6. Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico (HLF/B, n=10): Dieta hiperlipídica + Frutose (50 % banha de porco e 20% frutose) baseada na dieta AIN-93 e 2% de simbiótico B.

Inicialmente os animais tiveram uma semana de adaptação à dieta AIN-93 e dieta hiperlipídica + frutose (50% de banha) baseada na dieta AIN-93.

As dietas utilizadas foram baseadas no preconizado pelo American Institute of Nutrition, para a alimentação de roedores em fase de crescimento, (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Sendo assim, todos os grupos controle receberam dieta AIN-93 e AIN-93 suplementada com 2% simbiótico A e B. Já as dietas dos grupos hiperlipídica receberam dieta AIN-93, sendo que o amido e a sacarose foram substituídos por frutose, totalizando 20% nesses grupos. As dietas hiperlipídicas também foram hipercalóricas, com aumento da porcentagem dietética de lipídeos, sendo utilizado 50% de banha de porco. Os simbióticos suplementados são da marca "ORGANODOG" (Simbiótico – A) e "PET ORGANNACT" (Simbiótico – B) e foram

administrados juntamente à dieta na quantidade de 20 g/kg da dieta. A composição das dietas está descrita na tabela 1, e a tabela 2 mostra a composição dos simbióticos.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais (100 g).

Ingredientes	CT	CT/ A	CT/ B	HLF	HLF/ A	HLF/ B
Amido de milho	53	53	53	0	0	0
Caseína	20	20	20	20	20	20
Sacarose	10	10	10	0	0	0
Fibras	5	5	5	5	5	5
Mix de Mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix de Vitaminas	1	1	1	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
Óleo de soja	7	7	7	0	0	0
Frutose	0	0	0	20	20	20
Banha	0	0	0	50	50	50
Simbiótico A	0	2	0	0	2	0
Simbiótico B	0	0	2	0	0	2
Kcal/100g	395	395	395	611	611	611
Kcal/g	3,9	3,9	3,9	6,1	6,1	6,1

BHT - di-terc-butil metil fenol. CT – Grupo controle; CT/ A – grupo controle + simbiótico A; CT/ B – grupo controle + simbiótico B; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha); HLF/A - grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha) + simbiótico A; HLF/B - grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha) + simbiótico B.

Tabela 2 – Composição dos simbióticos utilizados (1000 g).

Discriminação	Simbiótico A	Simbiótico B
Marca	Organodog	Pet Organnact
Cálcio	315 g	0
Glucanos	5200 mg	0
Mananos	2800 mg	40 g
Carboidratos	8000 mg	0
Saccharomyces cerevisiae	2 x 10 ¹⁵ UFC	2 x 10 ¹¹ UFC
Bacillus cereus	1,2 x 10 ¹⁸ UFC	0
Bacillus subtilis	1,2 x 10 ¹⁸ UFC	0
Patabilizante (carne)	2000 mg	0
BHT	510 mg	0
Ácido Fólico	0	500 mg
Biotina	0	200 mg
Colina	0	300 mg
L- Glutamina	0	1500 mg
Metionina	0	20 g
Vitamina A	0	330000 UI
Vitamina B1	0	3500 mg
Vitamina B12	0	5000 µg
Vitamina B2	0	12g
Vitamina B6	0	600 mg

BHT - di-terc-butil metil fenol. UFC – Unidades Formadoras de Colônia.

A quantidade consumida de dieta e água, e o peso dos animais foram aferidas três vezes por semana no mesmo horário e, após estas pesagens a dieta e a água foram repostas, deixando sempre quantidade suficiente disponível. Ao final foi calculada a média de consumo semanal a partir de 3 dias de aferição.

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por anestesia de injeção intraperitoneal com cetamina e xilazina na dosagem de 100 mg/kg de cetamina para 10 mg/kg de xilazina, respectivamente. O sangue, o fígado e o tecido adiposo foram

coletados para as análises histológicas e bioquímicas. O sangue foi deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e logo em seguida centrifugado a 3500 rpm à 4°C durante 10 minutos para retirada do soro. O fígado, tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram pesados em balança de precisão e congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a – 40° C para posteriores análises bioquímicas. Foi retirado um fragmento do tecido hepático para a análise histopatológica.

2.1 Análises Histopatológicas do Fígado

Cortes histológicos submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina foram utilizados para avaliação e determinação do score de NAFLD e percentual de gotículas lipídicas. A determinação do grau de NAFLD foi realizado em 6 campos microscópicos no aumento de 400x em 7 animais por grupo, onde se avaliou os seguintes fatores: esteatose, inflamação lobular, inflamação crônicaportal, balonização e fibrose, onde cada categoria avaliada pode variar em um score de 0-3 (BRUNT et al., 2004, 2011). As análises quantitativas para a determinação do percentual de gotículas lipídicas foram realizadas no software Image-Pro Plus (versão 6.0; Media Cybernetics). Para tanto, foi aplicado o sistema de multipontos (Weibel, 1963) utilizando 416 transectos, sendo os dados expressos pela relação dos transectos positivos em relação ao total de transectos aplicados.

2.2 Quantificação de Gordura Hepática Total e Parâmetros Hepáticos

A determinação da gordura hepática total foi realizada de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959) adaptado. Para as análises: 250 mg de tecido hepático foram homogeneizados com 0,4 ml de água destilada, em tubos de 10 mL. Em seguida foi adicionado 1 ml de metanol e 0,5 ml de clorofórmio. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 0,5 ml de H₂O e 0,5 ml de clorofórmio. Uma nova agitação foi realizada por aproximadamente 2 minutos, e então os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 2 minutos para separação das camadas de clorofórmio (inferior) e aquosa (superior). Foi retirado aproximadamente 0,65 ml de clorofórmio e colocado em um tubo de ensaio contendo 0,5 g de sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água. Uma alíquota de 0,25 ml da fase de clorofórmio livre de água foi transferida para um béquer previamente pesado, o qual foi levado para uma estufa a 50°C. Após evaporar

todo o clorofórmio, repetiu-se a pesagem do béquer. O cálculo foi obtido através da diferença das pesagens do béquer, em relação à massa inicial do tecido utilizado.

A partir da extração de gordura hepática total foram realizadas através de kits comerciais Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) as dosagens de parâmetros hepáticos: colesterol e triglicerídeos.

2.3 Determinação da Peroxidação Lipídica Hepática

Esta análise foi feita de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al (1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA no soro, foram utilizados 200 µl de amostra. A determinação do MDA no fígado foi realizada com uma alíquota de 200 µl retirada do homogenato de fígado (200 mg de tecido em 1 mL de tampão fosfato). A este adicionou-se 650 µl de solução de 10 mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150 µl de HCL puro (37%). Logo após, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve o resfriamento das amostras em gelo e em seguida os eppendorfs foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorvância com comprimento de onda de 586 nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

2.4 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH) hepática e sérica

A dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) foi realizada no tecido hepático de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Cerca de 100 mg da amostra do tecido foi homogeneizada em um Potter com 4,0 mL de tampão EDTA (0,02M), sob gelo. Uma alíquota de 2,5 mL deste homogenato foi retirada, para a mistura a 2,0 mL de água deionizada e 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. A reação durou cerca de 15 minutos, posteriormente a amostra foi centrifugada por 15 minutos (4000 rpm a temperatura ambiente). Após a centrifugação foi retirado 1,0 mL do sobrenadante e adicionado 2,0 mL de tampão TRIS (0,4M, pH 8,9) e 0,05 mL de DTNB (ácido dititionitrobenzóico) (0,01M em metanol). A leitura foi feita no comprimento de onda de 412 nm, 5 minutos após a adição do DTNB, contra um branco com EDTA (0,02M) em lugar do sobrenadante. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M).

A glutationa reduzida sérica foi dosada por meio de uma alíquota de 25 µL de soro com a adição de 1 mL do tampão Tris-EDTA para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se A1. Posteriormente, 25 µL do DTNB foi adicionado à esta solução e após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura, obtendo-se A2, contra um branco de DTNB. Após a subtração dos valores obtidos A2-A1, a concentração na amostra foi calculada utilizando-se, uma curva padrão de GSH, expressa em mmol/L.

2.5 Determinação das concentrações séricas das Transaminases Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

As concentrações das transaminases séricas foram avaliadas com o uso de kits comerciais Labtest. O método foi descrito por uma transferência de agrupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos, formando, glutamato e oxalacetato ou o piruvato, que foram medidos pela formação de hidrazona, com a característica de cor intensa em meio alcalino. No procedimento 250 µL de substrato foi incubado em Banho Maria à 37° C durante 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 50 µL de amostra e a solução foi incubada em Banho Maria à 37° C por exatamente 30 minutos (ALT) e por exatamente 1 hora (AST). Foi adicionado 250 µL do reagente e a solução foi mantida à temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente, foi adicionado 2,5 mL de NaOH e após 5 minutos à temperatura ambiente foi realizada a leitura a 505 nm. A concentração de AST ou ALT das amostras foi obtida a partir da curva de calibração nas concentrações de zero, 28, 57, 97 e 150 Unidades/mL de um padrão conhecido de ALT, ou nas concentrações de zero, 24, 61, 114 e 190 Unidades/mL de um padrão conhecido de AST.

2.6 Determinação da vitamina E hepática

As análises hepáticas de vitamina E (α -tocoferol) foram realizadas por HPLC, segundo método adaptado de Arnaud et al (1991). Para as análises foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (150 x 4,6mm - 5µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; fase móvel composta por acetonitrila: diclorometano: metanol 7:2:1; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292 nm e 352 nm para α -tocoferol e retinol, respectivamente. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em nmoles/g de tecido para as análises hepáticas. Cerca de 200 mg de tecido foram

homogeneizados com 400 μL e 1 mL de etanol absoluto, respectivamente. Posteriormente foi adicionado 1 mL para tecido de heptano para extração. As amostras sofreram agitação em vórtex por 1 minuto e posterior centrifugação (3000 rpm durante 10 minutos). Foram retirados cerca de 500 μL do sobrenadante das amostras de tecido, e secos ao fluxo de nitrogênio. A ressuspensão dos resíduos secos foi realizada com 500 μL para a amostra de tecido da fase móvel, e então 20 mL foram injetados no cromatógrafo.

2.7 Determinação de Glicemia

A glicemia dos animais foi aferida ao final do experimento. As amostras foram obtidas pela cauda dos animais e os níveis foram mensurados usando teste de glicosímetro freestyle libe abbot®.

2.8 Análise Estatística

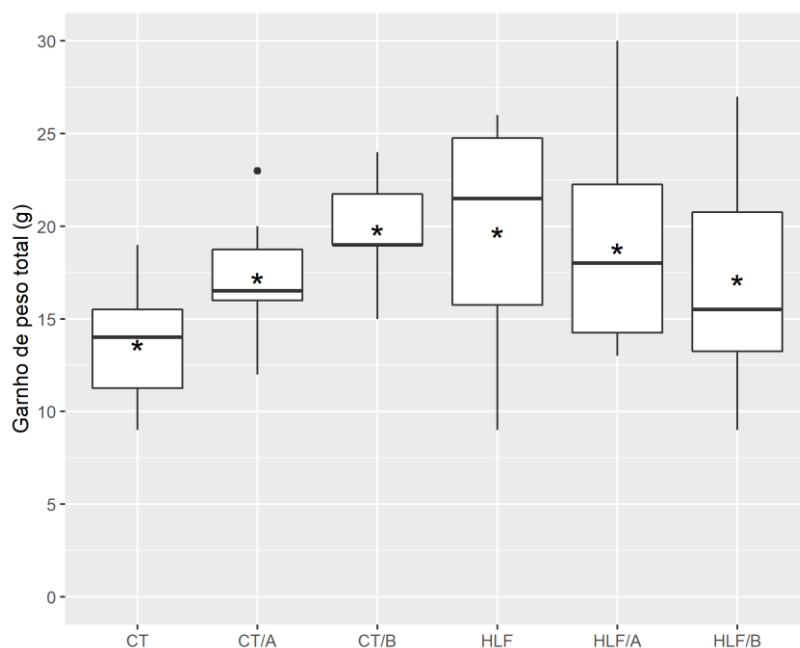
Inicialmente os dados foram descritos através de frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, desvio-padrão, mediana, quartis, mínimo e máximo (variáveis quantitativas). Para as comparações entre os grupos foi realizada a análise de covariância (ANCOVA). Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do software R, versão 4.0.4 e as análises, através do SAS 9.4. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5% (Montgomery, 2000).

3. RESULTADOS

3.1 Peso dos Animais

Na figura 1 estão representados o ganho de peso total dos grupos ao final das 16 semanas experimentais. Os animais do grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica rica em frutose apresentaram um ganho de peso maior em relação aos outros grupos.

Figura 1 – Ganho de peso total dos grupos ao final das 16 semanas experimentais (g).

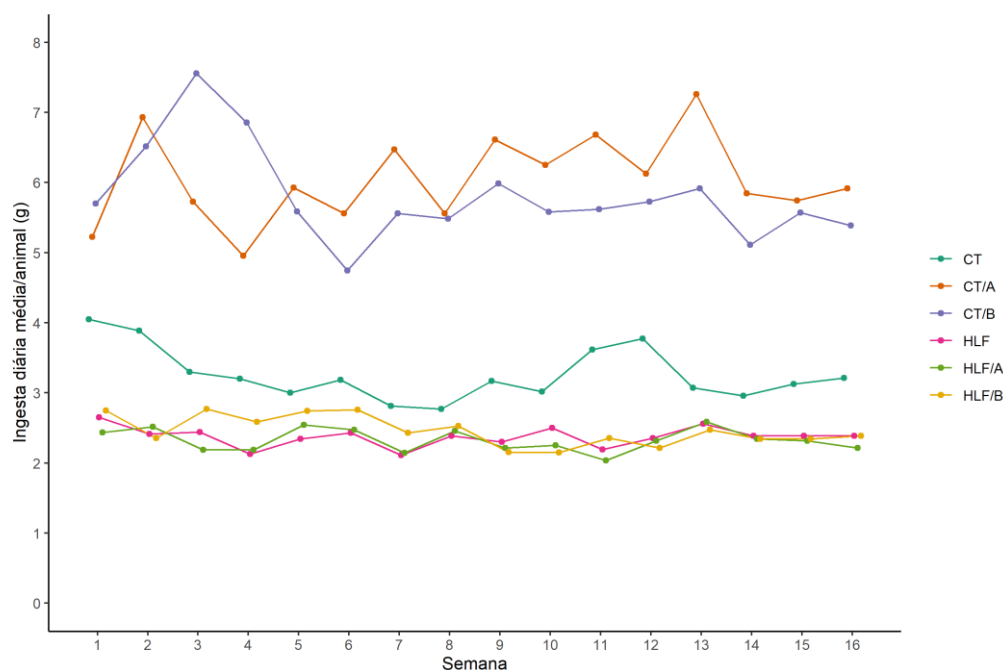


CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. *para $p < 0,05$.

3.2 Ingestão alimentar e energética

A figura 2 representa os dados da média de ingestão alimentar semanal dos animais durante o experimento, obtidos por uma média de três dias de consumo. Na primeira semana de adaptação da dieta, o grupo CT/A apresentou uma maior ingestão alimentar em relação aos demais grupos. Na terceira e quartas semanas experimentais o grupo CT/B apresentou uma maior ingestão alimentar em comparação aos demais grupos. Porém, a partir da quinta semana experimental o grupo CT/A aumentou significativamente sua ingestão alimentar quando comparado aos grupos CT, HLF, HLF/A e HLF/B ($p < 0,05$). A ingestão energética está de acordo com a média de consumo diário, mesmo com a administração de dieta hiperlipídica ($p < 0,01$) (tabela 3). A ingestão alimentar diária nos grupos controle que receberam suplementação de simbióticos foram significativamente maiores em relação aos grupos que receberam dieta hiperlipídica e controle ($p < 0,01$). Dessa forma, a ingestão energética foi maior nos grupos onde a ingestão foram significativamente maiores ($p < 0,01$).

Figura 2 – Ingestão alimentar ao longo do período experimental (g).



CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. *para $p < 0,05$.

Tabela 3 – Média de ingestão alimentar e energéticos diários.

	CT	CT/A	CT/B	HLF	HLF/A	HLF/B
Ingestão alimentar (g/dia)	3,26 (0,52)	6,05 (0,71)	5,81 (0,86)	2,37 (0,23)	2,33 (0,30)	2,46 (0,45)
Ingestão energética (Kcal/dia)	12,71 (1,47)	23,59 (2,42)*	22,64 (2,64)*	14,47 (0,87)	14,18 (0,98)	14,99 (1,29)
Ingestão de simbiótico (g/dia)	0	0,012	0,011	0	0,004	0,004

CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. *para $p < 0,05$.

3.3 Pesos dos tecidos

Em relação ao peso dos tecidos, não houve diferenças significativas entre as médias dos grupos quanto ao peso dos rins direito e esquerdo. Não houve diferença significativa em relação ao peso do tecido adiposo retroperitoneal. O grupo CT/B e HLF/A apresentaram maior média de peso do tecido adiposo epididimal em comparação aos demais grupos, porém não expressaram diferenças significativas. Quanto ao peso intestinal, não houve diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 4 – Peso dos tecidos rim direito, rim esquerdo, adiposo epididimal e retroperitoneal e intestinal (g).

	CT	CT/A	CT/B	HLF	HLF/A	HLF/B
Rim D	0,157 (0,028)	0,161 (0,013)	0,161 (0,018)	0,166 (0,026)	0,157 (0,027)	0,189 (0,008)
Rim E	0,16 (0,027)	0,16 (0,02)	0,155 (0,02)	0,162 (0,019)	0,154 (0,023)	0,185 (0,018)
TAR	0,638 (0,64)	0,548 (0,22)	0,741 (0,119)	0,649 (0,384)	0,67 (0,306)	0,529 (0,455)
TAE	1,011 (0,444)	1,491 (0,447)	2,037 (0,303)	1,58 (0,918)	1,938 (0,704)	1,375 (0,987)
Intestino	2,183 (0,217)	2,258 (0,287)	2,59 (0,39)	2,25 (0,581)	2,035 (0,468)	2,192 (0,552)

CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B; Rim D – rim direito; Rim E – rim esquerdo; TAR – Tecido adiposo retroperitoneal; TAE – Tecido adiposo epididimal. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

3.4 Gordura Hepática Total, Triglicerídeos e Colesterol hepáticos

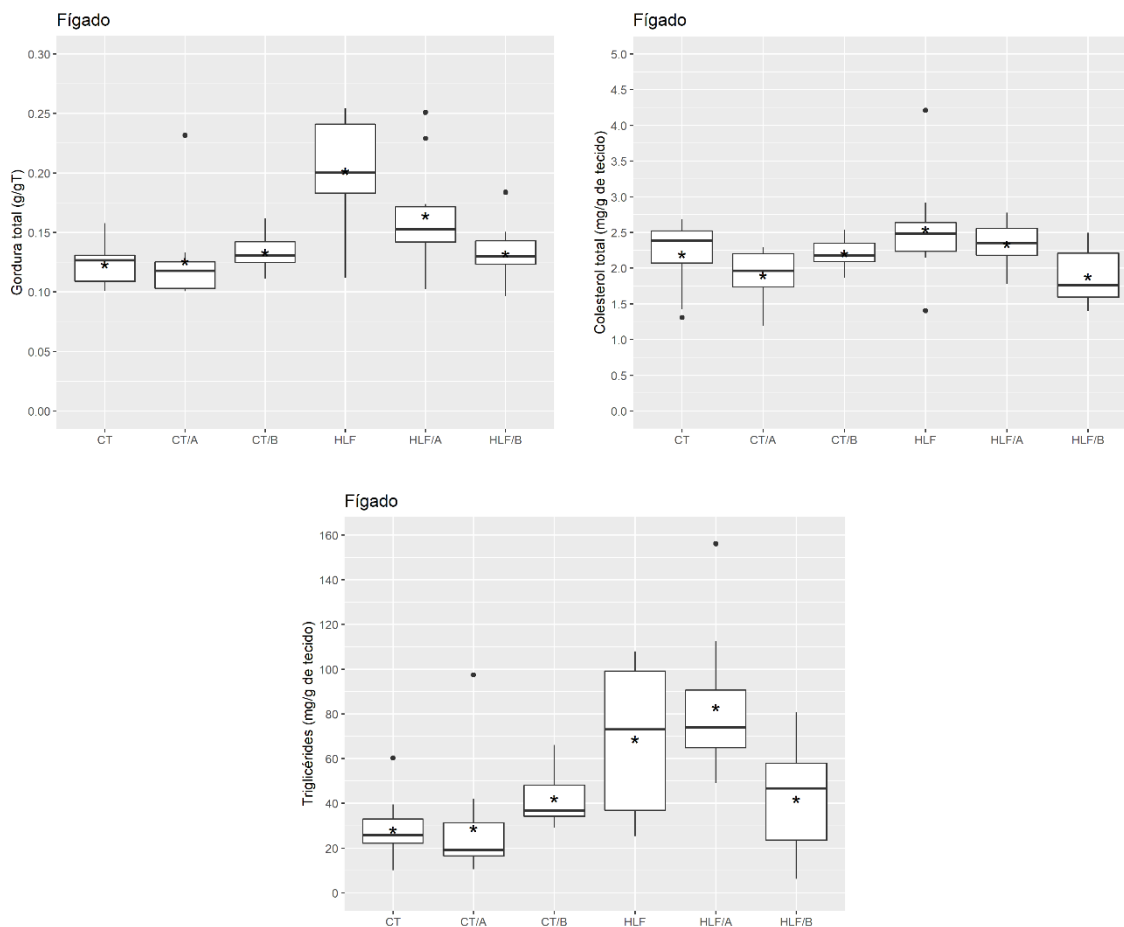
Em relação a gordura hepática total houve um maior acúmulo de gordura hepática no grupo HLF quando comparado aos grupos CT, CT/A, CT/B, HLF/A e HLF/B ($p < 0,01$). Entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica rica em frutose e suplementação com simbiótico, o grupo HLF/B apresentou um menor acúmulo de gordura hepática em relação ao grupo HLF ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos para o colesterol total. Em relação ao TGs, não houve diferenças significativas entre os grupos. Os dados estão representados na tabela 5 e figura 3.

Tabela 5 – Gordura hepática total, colesterol total e triglicérides.

	CT	CT-A	CT-B	HLF	HLF - A	HLF - B
Gordura hepática total (g/ gT)	0,123 (0,017)	0,126 (0,039)	0,133 (0,015)	0,202 (0,045)	0,164 (0,045)	0,132 (0,025)
Colesterol total (g/ g de tecido)	2,196 (0,478)	1,898 (0,379)	2,208 (0,195)	2,547 (0,711)	2,336 (0,297)	1,881 (0,386)
Triglicérides (g/ g de tecido)	28,232 (14,527)	28,95 (26,009)	42,279 (12,837)	68,644 (33,719)	82,916 (31,539)	41,977 (24,508)

CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

Figura 3 – Gordura hepática total, colesterol total e triglicerídeos hepáticos.

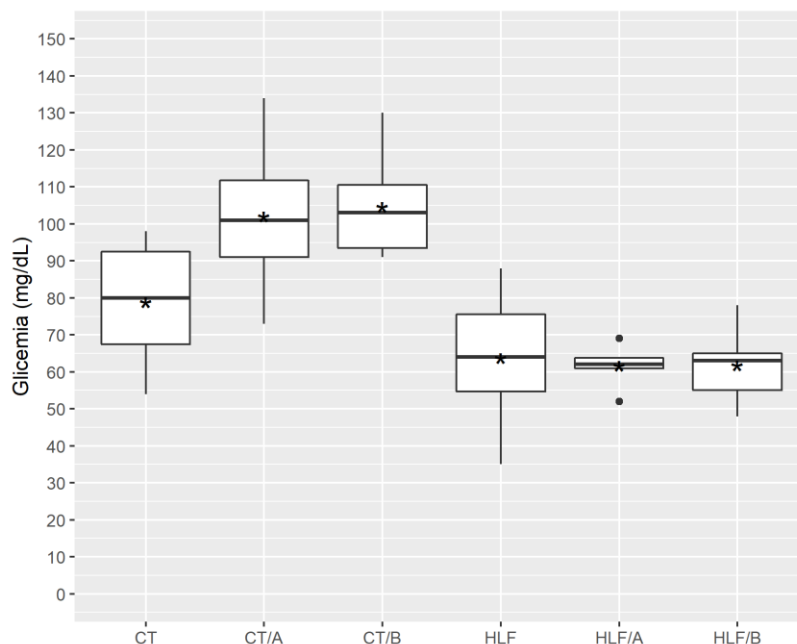


CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,01$).

3.5 Glicemia

Em relação à glicemia, os grupos CT/A e CT/B apresentaram maior índice glicêmico quando comparado aos grupos que receberam dieta hiperlipídica rica em frutose e suplementados com simbiótico, HLF, HLF/A e HLF/B ($p < 0,01$) (Figura 4).

Figura 4 – Valores médios de glicemia.



CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

3.6 Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

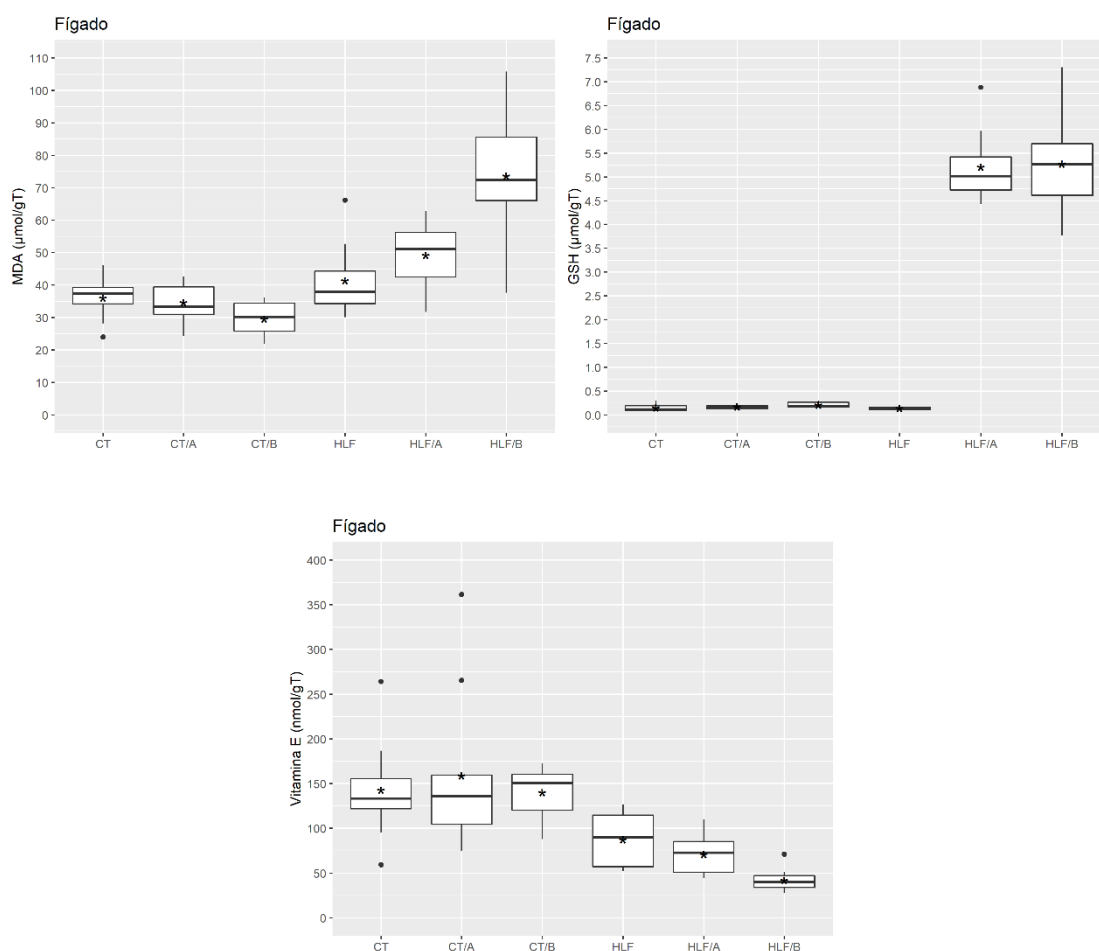
A peroxidação lipídica foi avaliada através do MDA presente no tecido hepático. O grupo HLF/B apresentou uma maior média de peroxidação lipídica em relação aos demais grupos ($p < 0,01$). Em relação aos parâmetros antioxidantes, os grupos HLF/A e HLF/B apresentaram uma maior média de GSH em comparação aos grupos CT, CT/A, CT/B e HLF ($p < 0,01$). Para vitamina E houve diferenças significativas entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica rica em frutose e dieta hiperlipídica rica em frutose suplementadas com simbiótico em comparação aos grupos que receberam dieta controle e controle suplementados com simbiótico ($p < 0,01$) (Figura 5). A tabela 6 mostra a relação entre vitamina E / MDA e GSH / MDA.

Tabela 6 – Relação Vitamina E / MDA e GSH / MDA.

	CT	CT-A	CT-B	HLF	HLF - A	HLF - B
MDA	36,1 (6,27)	34,6 (5,96)	29,5 (5,46)	41,4 (10,93)	49,2 (10,58)	73,58 (18,47)
VITAMINA E	143,1 (54,8)	158,7 (89,0)	140,3 (27,8)	87,3 (30,3)	70,9 (21,3)	41,9 (12,7)
GSH	0,15 (0,08)	0,17 (0,04)	0,21 (0,05)	0,138 (0,03)	5,21 (0,74)	5,27 (1,06)
Vitamina E / MDA	3,964	4,584	4,747	2,109	1,441	0,570
GSH / MDA	0,004	0,005	0,007	0,003	0,106	0,072

CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

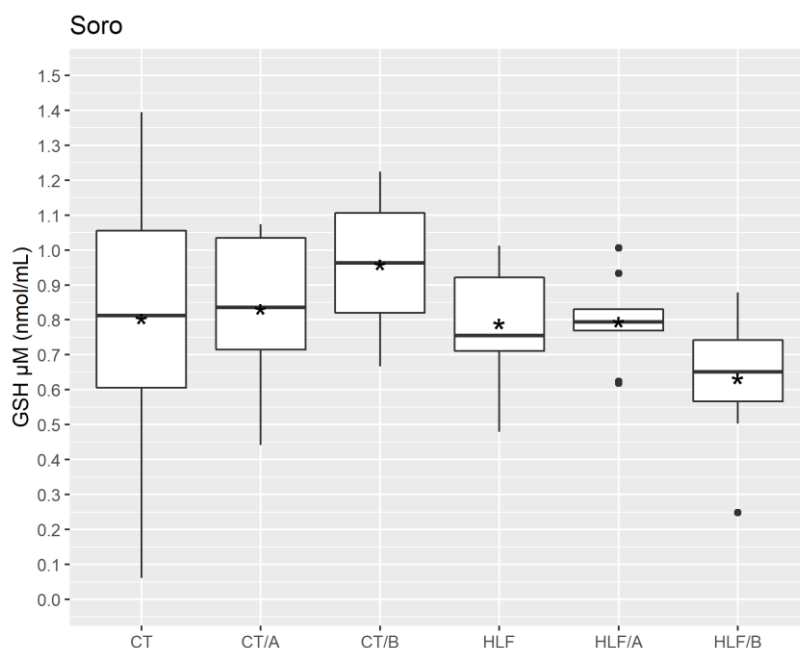
Figura 5 – Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E.



CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

Para o GSH sérico não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 6).

Figura 6 – Valores séricos de GSH.

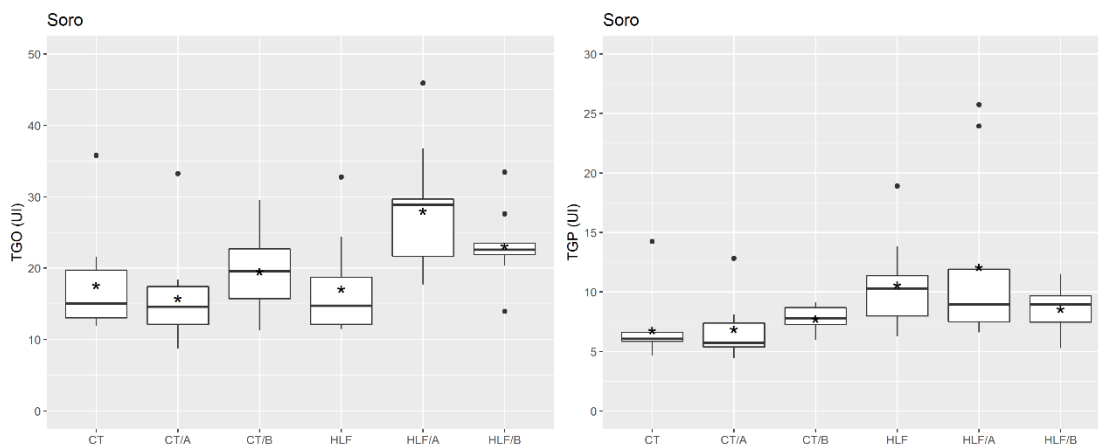


CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

3.7 Concentrações séricas das Transaminases Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

As concentrações séricas de AST e ALT (TGO e TGP, respectivamente), estão descritas na figura 7. Com relação ao TGO, não houve diferenças entre os grupos que receberam suplementação de simbióticos e os grupos que não receberam ($p < 0,01$). Para TGP não houve diferenças significativas entre os grupos.

Figura 7 – Concentrações médias de TGO e TGP.

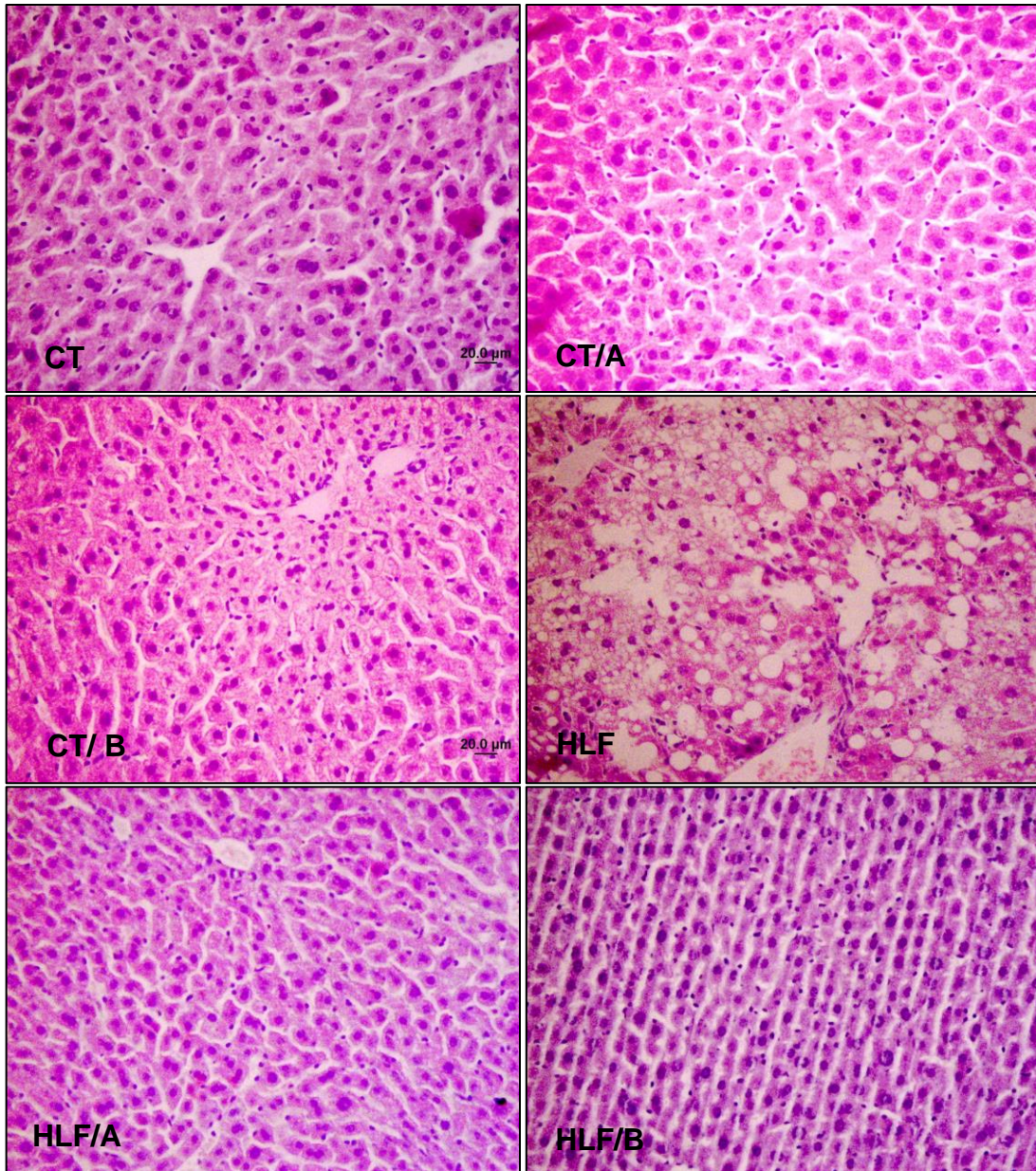


CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

3.8 Histologia Hepática

As amostras hepáticas foram coradas com eosina e hematoxilina para a avaliação de esteatose hepática, balonização e inflamação. Nenhum grupo apresentou inflamação (Figura 8).

Figura 8 – Microfotografias mostrando aspectos histológico do tecido hepático de animais dos grupos CT, CT/A, CT/B, HLF, HLF/A e HLF/B.



CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. *Número de animais por score apresentado.

Tabela – 7 Avaliação do score de esteatose hepática não alcoólica.

Grau de esteatose score (0-3)	CT	CT/A	CT/B	HLF	HLF/A	HLF/B
0	3	3	0	3	0	3
1	4	2	5	1	6	4
2	0	1	2	0	1	0
3	0	1	0	3	0	0

CT – Grupo Controle; CT/A – Grupo Controle + Simbiótico A; CT/B – Grupo Controle + Simbiótico B; HLF – Grupo Hiperlipídica + Frutose; HLF/A – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico A; HLF/B – Grupo Hiperlipídica + Frutose + Simbiótico B. Número de animais por score apresentado. Valores expressos em média e desvio padrão ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

As dietas ofertadas aos grupos controle foram normocalóricas, enquanto os animais que receberam dietas hiperlipídicas ricas em frutose foram hipercalóricas. A diferença entre o crescimento dos animais era esperado, o grupo HLF apresentou aumento de peso em relação aos demais grupos. O consumo de dieta variou durante o estudo, porém os grupos CT/A e CT/B mantiveram um maior consumo da dieta e ingestão energética em todo o período experimental em comparação aos demais grupos, mesmo assim esses animais demonstraram menor ganho de peso em relação aos grupos que receberam dieta hiperlipídica. A introdução da dieta hiperlipídica rica em frutose está associada à redução da ingestão alimentar, já que esta apresenta maior densidade calórica em relação à dieta controle. Neste estudo a ingestão alimentar não foi suficiente para refletir no ganho de peso dos animais que receberam dieta hiperlipídica rica em frutose suplementada com simbióticos em comparação ao grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica rica em frutose. O estudo de Kohli Rohit, et al., 2010, demonstrou aumento de peso nos animais que consumiram dieta hiperlipídica rica em frutose em relação ao grupo que consumiu dieta normocalórica após 16 semanas experimentais. Um outro estudo com camundongos c57/bl, mostrou que os animais alimentados com dieta hiperlipídica tiveram um maior ganho de peso durante 12 semanas experimentais em relação ao grupo que recebeu dieta controle. Esse mesmo estudo fez uso de probióticos para tratar obesidade e prevenir o ganho de peso em dietas ricas em gorduras e mostrou que animais alimentados com dieta hiperlipídica e suplementação de probiótico (*L. plantarum* K50) apresentaram um

ganho de peso significativamente menor do que o grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica (JOUNG, H., et al., 2021). Estudos demonstram que a modulação intestinal através de dietas são eficientes para provocar mudanças no metabolismo do hospedeiro (DAVID, L.A., et al., 2013, WU, G.D., et al., 2011).

Os grupos não apresentaram diferenças significativas para o peso dos tecidos rins direito e esquerdo, intestinal e tecido adiposo retroperitoneal e epididimal. Neste caso, a oferta de dieta ou o tempo experimental não foram suficientes para causar impacto no aumento de tecido adiposo. O estudo de JOUNG, H. et al., 2021, mostrou que animais alimentados com dieta hiperlipídica suplementados com probiótico durante 12 semanas, apresentaram menor peso do tecido adiposo epididimal em comparação aos animais que receberam apenas dieta hiperlipídica.

As dietas ricas em gorduras e carboidratos podem levar ao acúmulo de gordura hepática, inflamação e posterior surgimento e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (ABENAVOLI, L., et al., 2016). No presente estudo, houve um maior acúmulo de gordura hepática total no grupo HLF em comparação aos demais grupos. O grupo HLF/B apresentou significativa redução do acúmulo de gordura hepática em relação ao grupo HLF.

Em relação aos parâmetros bioquímicos apresentados no presente estudo, os grupos não apresentaram diferenças significativas para colesterol hepático. Um estudo recente comparou parâmetros bioquímicos de camundongos alimentados por dieta hiperlipídica, dieta hiperlipídica tratados com probiótico e dieta controle por 15 semanas e observou que os animais que receberam dieta hiperlipídica com suplementação de probiótico mostraram redução significativa nos níveis de colesterol plasmático em relação ao grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica (YOSHITAKE, R., 2020). O mesmo estudo também mostrou redução no acúmulo de triglicerídeos plasmáticos do grupo alimentado com dieta hiperlipídica suplementada com probiótico em comparação ao grupo hiperlipídica. O estudo de Joung, H., et al., 2021, também mostrou melhora significativa no perfil lipídico de animais alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com probiótico.

Apesar de não serem apresentadas diferenças significativas entre os grupos quanto à histologia hepática, podemos observar um maior grau de esteatose hepática em animais do grupo que recebeu dieta hiperlipídica rica em frutose em relação aos

demais grupos. Os grupos CT e HLF/B apresentaram menor evolução de esteatose. Um estudo usou simbióticos para avaliar a evolução do grau de esteatose em ratos Wistar e encontrou que quando administrados simbiótico em uma dieta hiperlipídica e rica em frutose ou dieta controle houve melhora no grau de esteatose em comparação aos grupos que não receberam simbióticos (TAGLIARI, E., et al., 2017). O estudo de Xu, R-Y., et al., 2012, suplementou probióticos diferentes na dieta hiperlipídica de ratos, e mostrou prevenção de DHGNA nesses animais em comparação aos animais que receberam apenas dieta hiperlipídica. Um estudo do Laboratório de Nutrição e Metabolismo (BEZAN, N. P., 2019) mostrou que camundongos alimentados com dietas hiperlipídicas rica em frutooligossacarídeos (FOS), apresentaram redução do grau de esteatose hepática não alcoólica em comparação aos grupos que não receberam o prebiótico. Sendo assim, a literatura está bem estabelecida em relação ao efeito protetor e de prevenção de DHGNA com a suplementação de probióticos e prebióticos.

Neste estudo foram realizadas análises de enzimas hepáticas ALT e AST para medir os parâmetros de função hepática. Para ALT pode-se observar um aumento elevado do grupo HLF/A. Não houve diferença entre os grupos para AST. Um estudo com ratos Wistar e administração de dieta controle, controle e simbiótico, hiperlipídica, hiperlipídica e simbiótico, encontrou diferenças significativas entre enzimas hepáticas, os grupos que receberam simbióticos na dieta apresentaram menor expressão de ALT e AST quando comparados aos grupos que não foram tratados (TAGLIARI, E., et al., 2017).

A glicemia de jejum apresentou um significativo aumento nos grupos CT/A e CT/B em relação aos grupos HLF, HLF/A e HLF/B. Em contrapartida, Grandl, G., et al., 2018, avaliaram a glicemia em jejum de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta rica em gorduras e carboidratos e dieta pobre em carboidratos, e mostrou que os animais que receberam dieta com baixo teor de carboidratos apresentaram uma redução da glicose plasmática em comparação aos demais grupos. Porém no presente estudo não foi observado diferença entre a glicemia para os grupos alimentados com dieta padrão e dieta rica em gorduras e carboidratos.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua neutralização pelas defesas antioxidantes. Estudos posteriores

mostraram que dietas hiperlipídicas podem aumentar a produção de radicais livres e causar estresse oxidativo, desempenhando um papel fundamental na progressão da DHGNA (TSIMIKAS, S., MILLER, Y. I., 2011). No presente estudo a dosagem de MDA foi usada como marcador de estresse oxidativo, onde o grupo HLF/B apresentou níveis significativamente aumentados em comparação aos demais grupos. Em relação à defesa antioxidante, foram realizadas dosagens de GSH hepático onde os grupos HLF/A e HLF/B apresentaram um aumento deste antioxidante. Sendo assim, a suplementação de simbiótico A pode ser eficaz em combater os radicais livres. Um estudo avaliou os efeitos da suplementação de simbióticos no estresse oxidativo em indivíduos com DHGNA e encontrou uma redução significativa no MDA (JAVADI, L., et al., 2018). Outro estudo avaliou os parâmetros de estresse oxidativo em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas e hiperlipídicas suplementadas com probióticos e encontrou que o grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica apresentou menor atividade de GSH e aumento de MDA em comparação aos grupos que receberam suplementação com probióticos (LI, C., et al., 2014). Estudos mostram que a suplementação de prebióticos promovem a redução de MDA, melhorando os parâmetros antioxidantes, e conseqüente melhora da progressão da DHGNA, já que os AGCC produzidos a partir destes estão relacionados à diminuição e até mesmo inibição de inflamação e melhora da oxidação lipídica (LU et al., 2016).

Com relação às dosagens de vitamina E os grupos CT, CT/A e CT/B foram maiores em comparação aos grupos HLF, HLF/A e HLF/B. A vitamina E é considerada um antioxidante, portanto, a preservação de vitamina E contribui para a preservação do GSH, já que esta enzima é utilizada na regeneração da vitamina E por meio da redução do radical tocoferol (VALKO et al., 2007). Dessa forma, uma hipótese seria que a alta taxa de peroxidação lipídica, evidenciado pelo aumento do MDA, ocasionou uma elevada taxa de níveis antioxidantes, representados pelo GSH usados para combater os radicais livres, o que resultou em baixos níveis de Vitamina E. Sendo assim, a suplementação de simbióticos foi eficaz no combate aos radicais livres derivados da dieta hiperlipídica.

5 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, o modelo misto de dieta hiperlipídica e rica em frutose administradas num período de 16 semanas, foi eficiente na indução de esteatose hepática não alcoólica.

A modulação da dieta hiperlipídica rica em frutose, com diferentes tipos de simbióticos, como forma de prevenção ou tratamento de esteatose hepática não alcoólica se mostrou eficiente. Em geral, houve manutenção do peso corporal dos animais que receberam simbióticos ao longo do experimento. O simbiótico A foi mais eficiente no combate ao estresse oxidativo em relação à administração de simbiótico B. Porém, em relação a gordura hepática total, TGs e colesterol total, o simbiótico B proporcionou uma maior proteção do acúmulo lipídico em comparação ao simbiótico A.

As diferenças observadas no metabolismo dos camundongos entre os tipos de simbióticos, pode ser explicada pela diferença na composição de probióticos e nutrientes. O simbiótico B, possui em sua composição, além de probióticos e prebióticos, vitaminas e outros nutrientes, alguns destes alvos de estudos que confirmaram a proteção contra DHGNA, como a colina e vitamina B12 (ARAO, Y., et al., 2020, HERNANDEZ, G.V., et al., 2020).

Para estudos futuros, fica a possibilidade de reunir a composição do simbiótico A e B, a fim de avaliar se, juntos, realizariam maior benefício ao hospedeiro. Além disso, nenhum estudo citado neste trabalho mostrou o uso de cepas bacterianas como os presentes na composição dos simbióticos, sendo assim, principalmente o probiótico *Saccharomyces cerevisiae* deve ser alvo de estudos posteriores, para melhor estabelecer os efeitos e funções metabólicas na prevenção e tratamento da DHGNA.

Dessa forma, a suplementação combinada de simbiótico e nutrientes, parece ser uma alternativa para a prevenção e tratamento de esteatose hepática não alcoólica, em dietas ricas em gorduras e carboidratos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São necessários estudos futuros que explorem melhor os tipos de probióticos e prebióticos (simbióticos), junto a outros nutrientes, na modulação intestinal e seu papel no metabolismo lipídico, sistema antioxidante, acúmulo de gordura hepática, e aplicabilidade prática em indivíduos com DHGNA.

7 BIBLIOGRAFIA

ABENAVOLI, L., MILIC, N., DI RENZO, L., PREVEDEN, T., MEDIĆ-STOJANOSKA, M., DE LORENZO, A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol** 2016; 22(31): 7006-7016.

AERON, G., MORYA, S. Probiotics as Therapeutics. **JARB** 2017, 2, 1–6.

ARAO, Y.; KAWAI, H.; KAMIMURA, K.; KOBAYASHI, T.; NAKANO, O.; HAYATSU, M.; USHIKI, T.; TERAJ, S. Effect of Methionine/Choline-Deficient Diet and High-Fat Diet-Induced Steatohepatitis on Mitochondrial Homeostasis in Mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2020, 527, 365–371.

ARNAUD, J.; et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β - + carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography.** v. 572, n. 1-2, p. 103-116, 1991.

ASRIH, M.; ORNAYVAZ, F.R. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. **Clinical Nutrition.** V.33. p. 186-190, 2014.

AZAD, M. A. K., SARKER, M., LI, T., YIN, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Res. Int.** 2018, 2018, 1–8

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; CAN. J. **Biochem. Physiol.** 1959, 37, 911.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. **Hum Pathol**, v. 35, n. 9, p. 1070 -82, 2004.

BUZZETTI, E., PINZANI, M., TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism.** 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012.

CASTRO, G. S., CALDER, P. C. Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Clinical Nutrition.** 37:37-55, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.01.006>. 2018.

CUSI, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis** 2009;13:545–63.

DAVID, L.A.; MAURICE, C.F.; CARMODY, R.N.; GOOTENBERG, D.; BUTTON, J.E.; WOLFE, B.E.; LING, A.V.; DELVIN, A.S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nat. Cell Biol.** 2013, 505, 559–563.

DUARTE, S. M., STEFANO, J. T., OLIVEIRA, C. P. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann. Hepatol.* 2019, 18, 416–421.

FORLANO, R., SIGON, G., MULLISH, B. H., YEE, M., MANOUSOU, P. Screening for NAFLD-Current Knowledge and Challenges. **Metabolites.** 2023 Apr 9;13(4):536. doi: 10.3390/metabo13040536.

FRIEDMAN, S.L., NEUSCHWANDER-TETRI, B.A., RINELLA, M., SANYAL, A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nat Med.** 2018;24(7):908-922. doi:10.1038/s41591-018-0104-9

GERARD-MONNIER D.; et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology.** v. 11, n. 10, p. 1176-83, 1998.

GOLABI, P., PAIK, J. M., ALQAHTANI, S., YOUNOSSI, Y., TUNCER, G., YOUNOSSI, Z. M. The burden of nonalcoholic fatty liver disease in Asia, Middle East and North Africa: data from Global Burden of Disease 2009-2019. **J Hepatol.** 2021;4:795–809.

GRANDL, G., STRAUB, L., RUDIGIER, C., ARNOLD, M., WUEEST, S., KONRAD, D., WOLFRUM, C. Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet. **J Physiol.** 2018 Oct;596(19):4597-4609. doi: 10.1113/JP275173.

GUILHERME, A., VIRBASIUS, J. V., PURI, V., et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008;9:367–7

HERNANDEZ, G.V.; SMITH, V.A.; MELNYK, M.; BURD, M.A.; SPRAYBERRY, K.A.; EDWARDS, M.S.; PETERSON, D.G.; BENNET, D.C.; FANTER, R.K.; COLUMBUS, D.A.; et al. Dysregulated FXR-FGF19 Signaling and Choline Metabolism Are

Associated With Gut Dysbiosis and Hyperplasia in a Novel Pig Model of Pediatric NASH. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 2020, 318, g582–g609.

JAVADI, L. et al. Pro-and prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 1031, 2018.

KIRPICH, I. A., MARSANO, L. S., MCCLAIN, C. J. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Biochem** 2015; 48(13-14):923–30.

KOBYLIAK, N., et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutr Metab (Lond)** 13:14. doi:10.1186/s12986-016-0067-0. 2016.

KOBYLIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutr J** 15:43. doi: 10.1186/s12937 - 016 - 0166 - 9. 2016.

KOHLI, R., KIRBY, M., XANTHAKOS, S.A., SOFTIC, S., FELDSTEIN, A. E., SAXENA, V., TANG, P.H., MILES, L., MILES, M.V., BALISTRERI, W.F., WOODS, S.C.,

LU, Q., TIAN, X., WU, H., HUANG, J., LI, M., MEI, Z., ZHOU, L., XIE, H., ZHENG, S. Metabolic changes of hepatocytes in NAFLD. **Front. Physiol.** 2021, 12, 710420

LU, Y., et al. Short Chain Fatty Acids Prevent High Fat Diet induced Obesity in Mice by Regulating G Proteincoupled Receptors and Gut Microbiota. **Sci. Rep.**, China, v. 6, p. 37589, 2016.

MA, J., FOX, C. S., JACQUES, P. F., et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham heart study cohorts. **J Hepatol** 2015;63:462–9.

MONTGOMERY, D. C., Design and Analysis of Experiments. 5a edição, **John Wiley & Sons**, Inc., Nova Iorque, 2000.

MOORE, J. B., GUNN, P. J., FIELDING, B.A. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients** 2014;6:5679–703.

MORELLI, L., CAPURSO, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. **J. Clin. Gastroenterol.** 2012, 46, S1–S2.

MUNDI, M.S., VELAPATI, S., PATEL, J., KELLOGG, T.A., ABU DAYYEH, B.K. AND HURT, R.T. (2020), Evolution of NAFLD and Its Management. **Nutrition in Clinical Practice**, 35: 72-84. <https://doi.org/10.1002/ncp.10449>

MUNTEANU, C., SCHWARTZ, B. The Effect of Bioactive Aliment Compounds and Micronutrients on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Antioxidants** (Basel). 2023 Apr 10;12(4):903. doi: 10.3390/antiox12040903. PMID: 37107278; PMCID: PMC10136128.

ODDY, W.H., et al. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. **Am J Gastroenterol** 108:778–785. doi:10.1038/ajg.2013.

PAIK, J. M., GOLABI, P., YOUNOSSI, Y., SRISHORD, M., MISHRA, A., YOUNOSSI, ZM. The growing burden of disability related to nonalcoholic fatty liver disease: data from the Global Burden of Disease 2007-2017. **Hepatol Commun.** 2020;4:1769–80.

POWELL, E.E., WONG, V. W. S., RINELLA, M. Non-alcoholic fatty liver disease. **Lancet** 2021, 397, 2212–2224

PRECUP, G., POCOL, C. B., TELEKY, B. E., VODNAR, D. C. Awareness, Knowledge, and Interest about Prebiotics - A Study among Romanian Consumers. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 2022, 19, 1208.

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition.** Nov: 123(11):1939-51, 1993.

SAVCHENIU, O., et al. Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity, prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity. **BMC Complement Altern Med** 14:247. doi:10.1186/1472-6882-14-247. 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEELEY, R.J. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. 2010 Sep;52(3):934-44. doi: 10.1002/hep.23797.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Monotemático - Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Disponível em: http://www.sbhepatologia.org.br/pdf/revista_monotematico_hepato.pdf

TAGLIARI, E., CAMPOS, A. C., COSTA-CASAGRANDE, T. A., SALVALAGGIO, P. R. The impact of the use of symbiotics in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model. **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2017;30(3):211-215 DOI: /10.1590/0102-6720201700030011.

TILG, H., MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology** 2010;52:1836–46.

TOPPING, D. L., CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol Rev** 2001;81:1031–64

VALCHEVA, R., DIELEMAN, L. A. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol**. 2016, 30, 27–37.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WEIBEL, E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**. 1963;12:131-155

WU, G.D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.Y.; KEILBAUGH, S.A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science** 2011, 334, 105–108.

XU, R., WAN, Y., FANG, Q., LU, W., CAI, W. Supplementation with probiotics modifies gut flora and attenuates liver fat accumulation in rat nonalcoholic fatty liver disease model. **J. Clin. Biochem. Nutr.** | January 2012 | vol. 50 | no. 1 | 72–77. doi: 10.3164/jcfn.1138.

YOUNOSSI, Z. M., GOLABI, P., PAIK, J. M., HENRY, A., VAN DONGEN, C., HENRY, L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. **Hepatology**. 2023 Apr 1;77(4):1335-1347. doi: 10.1097/HEP.0000000000000004. Epub 2023 Jan 3.

YOUNOSSI, Z. M., STEPANOVA, M., ONG, J., TRIMBLE, G., ALQAHTANI, S., YOUNOSSI, I., et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly increasing indication for liver transplantation in the United States. **Clin Gastroenterol Hepatol**. 2021;19:580–9. e5.