

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

TAYNÁ NERY BANCKES

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM KEFIR NO COMPORTAMENTO DE RATOS
MACHOS SUBMETIDOS A UMA DIETA DE CAFETERIA

PONTA GROSSA
2023

TAYNÁ NERY BANCKES

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM KEFIR NO COMPORTAMENTO DE RATOS
MACHOS SUBMETIDOS A UMA DIETA DE CAFETERIA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biomédicas na Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração:
Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

PONTA GROSSA
2023

Banckes, Tayná Nery

B213 Efeito da suplementação com kefir no comportamento de ratos machos submetidos a uma dieta de cafeteria / Tayná Nery Banckes. Ponta Grossa, 2023.
62 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração:
Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro.

1. Transtorno mental. 2. Obesidade. 3. Kefir. 4. Dieta de cafeteria. I. Ferro, Marcelo Machado. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. III.T.

CDD: 613.25



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA 01/2023 DA MESTRANDA TAYNÁ NERY BANCKES, REALIZADA NO DIA 28 DE FEVEREIRO DE 2023, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte três, às 14h00min, em conformidade com o Art.2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através do sistema de web conferencia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em seção pública, sob a presidência do **Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Tayná Nery Banckes** na linha de pesquisa Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo – Ciências Biológicas e da Saúde/Unioeste** e **Prof. Dr. Edmar Miyoshi – Farmácia/UEPG**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Efeito da suplementação com kefir no comportamento de ratos machos submetidos a uma dieta de cafeteria”** Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **Aprovada**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Alteração de título: Não

Sugestão:

Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro – Biologia Geral/UEPG

SANDRA LUCINEI BALBO

Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo – Ciências Biológicas e da Saúde/Unioeste

Prof. Dr. Edmar Miyoshi - Farmácia/UEPG

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido e a todas as pessoas queridas que me acompanharam nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Solange Banckes, que me ajudaram a chegar até aqui, me oferecendo a oportunidade de estudar e estando sempre presentes.

Ao meu amado marido Leonardo de França, que me acompanhou nesses dois anos de mestrado, estando sempre ao meu lado, dividindo os momentos bons e os não tão bons.

Às alunas de Iniciação Científica Ana Paula F. dos Santos e Lethicia Bueno, que me auxiliaram em todas as etapas da pesquisa.

Aos meus amigos, Érica Nascimento e Gabriel Bueno, por estarem presentes dividindo os altos e baixos da vida, da pesquisa e pelos momentos de descontração desde a graduação.

À minha amiga Joana Bérghamo, que me ensinou muita coisa ao longo dos experimentos e compartilhou comigo as conquistas e os contratempos nos dois últimos anos.

Ao Prof. Dr. Marcelo M. Ferro, pela orientação, pela troca de conhecimentos e todo o incentivo.

À Profa. Dra. Dionizia X. Scomparin, que acompanhou a pesquisa e sempre buscou contribuir e auxiliar.

Às funcionárias do biotério, Mari e Jô, e ao técnico de laboratório Marcelo Paulo, que sempre estiveram à disposição e contribuíram para o andamento da pesquisa.

À empresa Bioclin, pela doação dos kits utilizados nas análises bioquímicas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, instituição que se tornou minha segunda casa, pela oportunidade em realizar meus estudos de graduação e mestrado.

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial causada principalmente pelo consumo de alimentos ultraprocessados e inatividade física. Ela é caracterizada por um processo inflamatório crônico de baixo grau que é relacionado a doenças metabólicas, comprometimento da memória e alterações comportamentais, como a depressão e ansiedade. Estudos mostram que a microbiota intestinal é capaz de modular o metabolismo e o comportamento do hospedeiro por meio do eixo intestino-cérebro, o que pode ser desequilibrado por uma dieta rica em gordura e carboidratos. O probiótico kefir é uma bebida láctea produzida pela ação de bactérias e leveduras, e vem mostrando inúmeros benefícios como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e capaz de modular a composição intestinal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com kefir no comportamento de ratos alimentados com dieta de cafeteria. Foram utilizados 46 ratos machos da linhagem Wistar, divididos em quatro grupos: controle-leite (CON-L), controle-kefir (CON-K), dieta de cafeteria-leite (CAF-L) e dieta de cafeteria-kefir (CAF-K). Os grupos CON foram alimentados com ração comercial e suplementados com 2 ml de leite ou kefir e os grupos dieta alimentados com dieta de cafeteria e suplementados com 2 ml de leite ou kefir, ambos por gavagem diariamente durante 30 dias. Ao longo de onze semanas os animais foram pesados e foi calculado o seu consumo alimentar. Foram realizados testes comportamentais para avaliar o comportamento tipo ansioso, depressivo e sua locomoção. Os ratos foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA), *splash test* (ST), nado forçado (NF) e reconhecimento de objetos (RO). Os grupos alimentados com dieta de cafeteria tiveram aumento no ganho de peso corporal, no consumo alimentar e ingestão calórica ao longo das semanas, aumento nos estoques de tecido adiposo perigonadal, retroperitoneal e mesentérico, além de aumento na concentração plasmática de glicose em relação aos grupos que consumiram ração. Os animais não apresentaram comportamento tipo ansioso no LCE ou comportamento tipo depressivo nos testes de NF e ST. Os testes de CA e as entradas no braço fechado do LCE demonstram que não houve alterações na motilidade dos animais. E o teste de RO não mostrou diferença na memória de curto prazo dos animais. A dieta CAF gerou obesidade nos animais, no entanto, não promoveu mudanças no comportamento. O fornecimento da dieta por mais tempo pode ser necessário para desenvolver os transtornos mentais no modelo animal. O kefir não foi capaz de reduzir os parâmetros alterados pela obesidade e interferir no comportamento dos ratos.

Palavras-chave: Transtorno mental. Obesidade. Kefir. Dieta de cafeteria.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease caused mainly by the consumption of ultra-processed foods and physical inactivity. It is characterized by a low-grade inflammatory process that is related to metabolic diseases and behavioral changes, such as depression and anxiety. Studies show that the intestinal microbiota is capable of modulating the host's metabolism and behavior through the intestine-brain axis, however, it can be impaired by a diet rich in fat and carbohydrates. The probiotic kefir is a dairy drink produced by the action of bacteria and yeasts and has shown several benefits such as anti-inflammatory activities, antioxidants and can modulate an intestinal composition. The aim of this research was to evaluate the effect of kefir supplementation on the behavior of rats fed a cafeteria diet. Forty-six male Wistar rats were divided into four groups: control-milk (CON-L), control-kefir (CON-K), cafeteria-milk diet (CAF-L) and cafeteria-kefir diet (CAF-K). The CON groups were fed with commercial chow and supplemented with 2ml of milk or kefir and the diet groups fed with cafeteria diet and supplemented with 2ml of milk or kefir, both by gavage daily for 30 days. Over eleven weeks the animals were weighed and their food consumption was calculated. Behavioral tests were performed to assess depressive and anxiety-like behavior. The rats were submitted to the elevated plus maze test (EPM), open field (OF), splash test (ST), forced swimming (FS) and object recognition (OR). The groups fed with a cafeteria diet had an increase in body weight gain, food consumption and caloric intake over the weeks, an increase in the stores of adipose tissue, peritonadal, retroperitoneal and mesenteric, in addition to an increase in the plasmatic concentration of glucose in relation to the groups who consumed feed. The animals did not show anxiety-like behavior in the EPM or depressive-like behavior in the NF and ST tests. CA tests and entries into the closed arm of the EPM demonstrate that there were no changes in the motility of the animals. And the OR test showed no difference in the short-term memory of the animals. The CAF diet generated obesity in the animals, however, it did not promote changes in behavior. Providing the diet for a longer period may be necessary to develop mental disorders in the animal model. Kefir was not able to reduce the parameters altered by obesity and interfere in the behavior of the rats.

Keywords: Mental disorder. Obesity. Kefir. Cafeteria diet.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 OBESIDADE	11
2.1.1 Papel do tecido adiposo na obesidade.....	11
2.1.2 Sistemas neurais envolvidos na ingestão alimentar.....	12
2.1.3 Obesidade e memória	14
2.1.4 Obesidade, ansiedade e depressão.....	15
2.2 DIETA DE CAFETERIA.....	16
2.3 MICROBIOTA E KEFIR.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 ANIMAIS.....	20
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	20
4.3 DIETA DE CAFETERIA.....	21
4.4 PREPARO E SUPLEMENTAÇÃO COM O KEFIR.....	22
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	23
4.5.1 Labirinto em cruz elevado	23
4.5.2 Campo aberto.....	24
4.5.3 Reconhecimento de objetos	24
4.5.4 Splash test.....	25
4.5.5 Nado forçado.....	26
4.6 DADOS BIOMÉTRICOS.....	27
4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	27

4.8 BOX-PCR FINGERPRINTING	28
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS.....	30
5.1 EVOLUÇÃO DE PESO AO LONGO DAS SEMANAS.....	30
5.2 SOMA DAS GORDURAS CORPORAIS	31
5.3 GORDURA PERIGONADAL, RETROPERITONEAL E MESENTÉRICA	32
5.4 ÍNDICE DE LEE	33
5.5 INGESTÃO CALÓRICA POR SEMANA.....	33
5.6 CONSUMO ALIMENTAR	34
5.7 GLICOSE, COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS.....	35
5.8 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	36
5.8.1 Labirinto em cruz elevado	36
5.8.2 Campo aberto.....	37
5.8.3 Reconhecimento de objetos	39
5.8.4 <i>Splash test</i>	39
5.8.5 Nado Forçado.....	40
5.9 CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR	41
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A – Carta de aprovação CEUA.....	61

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (OMS, 2021). Ela é resultante de um desequilíbrio energético entre as calorias ingeridas e calorias gastas (TORRES; NOWSON, 2007). Essa doença possui uma etiologia complexa, envolvendo fatores fisiológicos, genéticos, alterações epigenéticas, alterações da microbiota, além de aspectos socioeconômicos e culturais (TORRES; NOWSON, 2007; WRIGHT; ARONNE, 2012; APOVIAN, 2016; LORENZO *et al.*, 2020).

O aumento da inatividade física e o acesso fácil a alimentos ultraprocessados, que são ricos em açúcar, gordura e sódio, fez com que o número de indivíduos obesos aumentasse nas últimas décadas (WRIGHT; ARONNE, 2012). Esse aumento foi observado tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (APOVIAN, 2016).

No Brasil, a prevalência de obesidade aumentou significativamente de 20,8% para 25,9% entre os anos de 2013 e 2019 (FERREIRA *et al.*, 2021). Esse crescimento é preocupante, visto que a obesidade está associada a diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, diabetes tipo 2, câncer, osteoartrite, sendo também um fator de risco para a depressão (PREISS; BRENNAN; CLARKE, 2013; APOVIAN, 2016) e agravamento da infecção pelo Coronavírus (COVID-19) (BOLSONI-LOPES; FURIERI; ALONSO-VALE, 2021).

A depressão e a ansiedade são os transtornos mentais que mais atingem pessoas pelo mundo. De acordo com informações divulgadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), a depressão é uma das principais causas de incapacidade e atinge cerca de 322 milhões de indivíduos, sendo esse transtorno mais comuns em mulheres do que os homens.

A depressão está associada a uma resposta inflamatória crônica de baixo grau (BERK *et al.*, 2013) e estudos mostram que há uma prevalência de sintomas depressivos em pacientes que sofrem de obesidade, diabetes tipo 2 e/ou síndrome metabólica (LASSELIN; CAPURON, 2014). A obesidade vem sendo relacionada a esse transtorno, visto que é uma inflamação crônica de baixo grau que libera citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) (PRADO *et al.*, 2009).

As mudanças nas comunidades microbianas intestinais são associadas a uma variedade de distúrbios. A perda da variabilidade de microrganismos também é relacionada a obesidade, doenças inflamatórias intestinais (DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2011) e transtornos de ansiedade e depressão (SIMPSON *et al.*, 2021), o que demonstra uma interação bidirecional do eixo intestino-cérebro (EVRENSEL; TARHAN, 2021). Esse eixo consiste na comunicação entre o sistema nervoso central e entérico, onde a microbiota envia sinais para o cérebro e do cérebro para a microbiota intestinal por meio de ligações neurais, endócrinas e imunes, conectando assim os centros emocionais e cognitivos do cérebro com funções intestinais periféricas (CARABOTTI *et al.*, 2015).

Os probióticos são um grupo amplo de microrganismos que causam benefícios a um indivíduo quando ingeridos de maneira adequada (DINAN; QUIGLEY, 2011). Entre eles podemos citar os fermentados, como a kombucha, iogurte e kefir, sendo os dois últimos amplamente estudados (PRADOS-BO *et al.*, 2022). O kefir é uma bebida fermentada com origem na região do Cáucaso, produzida a partir do processo de fermentação do leite por bactérias e leveduras presentes nos grãos de kefir, estes possuem uma diversidade de espécies que dependem da sua origem geográfica, da temperatura, do leite utilizado e as condições de fermentação (TAN; CHAMUNDESWARI; LOO, 2020). Estudos apontam benefícios deste probiótico, como diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios e aumento das moléculas anti-inflamatórias no sistema imunológico do intestino (CARASI *et al.*, 2015) e melhora no comportamento depressivo e ansioso em animais (NOORI *et al.*, 2014).

Assim, uma vez que obesidade diminui a qualidade de vida de indivíduos e é associada a várias outras comorbidades, como a ansiedade e a depressão, e todos esses fatores parecem ser modulados pela microbiota intestinal, levantamos a hipótese de que a suplementação com o probiótico kefir possa atenuar o desenvolvimento da obesidade e ter efeito benéfico no comportamento de ratos alimentados com uma dieta de cafeteria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OBESIDADE

A prevalência de sobrepeso e obesidade vem crescendo entre adultos, adolescentes e crianças em todo o mundo (ROBERTO *et al.*, 2015), em 2016 mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso e destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos (OMS, 2021). O sobrepeso e a obesidade são fatores de riscos para doenças crônicas não transmissíveis como doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns tipos de câncer (OMS, 2022), sendo a doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral as principais causas de morte no mundo (OMS, 2019). Essas condições, além de serem prejudiciais à vida, também geram impactos na economia, visto que grandes gastos são necessários para tratar pacientes obesos (BERTHOUD; MORRISON; MÜNZBERG, 2020).

O método mais utilizado para avaliar se uma pessoa está com o peso normal, abaixo ou acima dele é o Índice de Massa Corporal (IMC). Ele é calculado dividindo o peso corporal em quilogramas pela altura em metros ao quadrado (MELDRUM; MORRIS; GAMBONE, 2017). Um IMC ≥ 25 kg/m² é definido como sobrepeso, ≥ 30 kg/m² é considerado obeso (grau 1), com obesidade grave e mórbida definida como IMC de 35 a < 40 kg/m² (grau 2) e $40 \geq$ kg/m² (grau 3) (OMS, 2010). Estudos ao longo da pandemia de COVID-19 mostram que indivíduos obesos estão associados a grandes aumentos significativos na hospitalização, necessidades de cuidados clínicos intensivos e mortalidade, indicando que um IMC mais alto está associado ao aumento da gravidade da doença (POPKIN *et al.*, 2020; BUNN *et al.*, 2022).

2.1.1 Papel do tecido adiposo na obesidade

O corpo humano contém vários tipos de depósitos de gordura, geralmente divididos em gordura branca e marrom. O marrom é predominante em recém-nascidos e pequenos mamíferos e auxilia na sobrevivência em baixas temperaturas, já o branco é um tecido metabolicamente ativo associado a homeostase energética em adultos, sendo responsável por armazenar o excesso de energia como triglicerídeos (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2010).

O tecido adiposo funciona como um órgão endócrino, o qual secreta diferentes substâncias bioativas, conhecidas como adipocinas, que possuem atividades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (PRADO *et al.*, 2009), com destaque para a leptina, TNF- α , adiponectina, resistina, interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 β (IL-1 β) (QUEIROZ *et al.*, 2009).

No desenvolvimento da obesidade, ocorre a expansão do tecido adiposo branco devido ao aumento de volume dos adipócitos pré-existentes pelo acúmulo de triglicérides e a formação de novos adipócitos. Essas mudanças fazem com que ocorra uma secreção desregulada das adipocinas pró e anti-inflamatórias, onde a maioria estimula respostas inflamatórias, sendo regulada positivamente na obesidade e estando ligada a complicações dessa doença, como doenças metabólicas e cardiovasculares (OUCHI *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2019). A adiponectina e a leptina são as adipocinas mais abundantes produzidas pelo tecido adiposo, com atividade anti e pró-inflamatória, respectivamente (TILG; MOSCHEN, 2006).

A resposta inflamatória crônica de baixo grau observada em indivíduos obesos se deve a uma infiltração de macrófagos no tecido adiposo, onde muitas adipocinas pró-inflamatórias são produzidas pelos adipócitos e também pela infiltração de macrófagos, mantendo um ciclo vicioso do tecido altamente inflamado e metabolicamente disfuncional (TILG; MOSCHEN, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2009). No tecido adiposo magro há a expressão de marcadores de um estado de macrófagos M2 ou alternativamente ativado, ao passo que no tecido adiposo obeso ocorre o recrutamento e acúmulo de macrófagos M1 ou classicamente ativados, como células T, gerando danos aos tecidos e a sinalização pró-inflamatória (OUCHI *et al.*, 2011).

A hipertrofia dos adipócitos é associada ao aumento da inflamação no tecido adiposo, visto que diminui o fluxo sanguíneo, podendo levar a hipóxia e a infiltração de macrófagos no tecido, promovendo uma regulação positiva de mediadores pró-inflamatórios, assim como ocorre também na presença de adipócitos mortos ou danificados (WENSVEEN *et al.*, 2015; CHAKAROV; BLÉRIOT; GINHOUX, 2022).

2.1.2 Sistemas neurais envolvidos na ingestão alimentar

Múltiplos sistemas neurais controlam a ingestão de alimentos e o peso corporal. Há uma íntima relação entre os sistemas neurais homeostáticos clássicos e hedônicos que controlam o apetite, a ingestão alimentar, o equilíbrio energético e o

peso corporal (HALL; HAMMOND; RAHMANDAD, 2014). O hipotálamo é conhecido como um centro chave para a percepção da fome e o comportamento alimentar, possui conexões bidirecionais com outras regiões do cérebro como o rombencéfalo e o sistema córtico límbico, que inclui grandes áreas corticais, gânglios da base, hipocampo e amígdala (GADDE *et al.*, 2018).

Sinais circulantes e neurais são detectados pelo sistema homeostático clássico no tronco encefálico e núcleos hipotalâmicos que controlam a ingestão e o gasto de energia subconscientemente (BERTHOUD; MORRISON; MÜNZBERG, 2020). O sistema hedônico percebe sinais do ambiente, analisa o valor emocional e de recompensa por meio do aprendizado e memória, tendo papel na ingestão e gasto energético por meio de ações voluntárias do consciente e inconsciente (BERTHOUD; MORRISON; MÜNZBERG, 2020).

Entre os sinais circulantes associados ao controle da homeostase energética está a leptina, uma adipocina que regula a ingestão alimentar e o gasto energético através do sistema nervoso central (OUCHI *et al.*, 2011). Sua produção é proporcional à quantidade de gordura corporal, sendo os níveis circulantes maiores em indivíduos obesos em relação a indivíduos magros (IZQUIERDO *et al.*, 2019).

No cérebro, neurônios de diversos núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação energética expressam receptores de leptina (LEPR) (CARON *et al.*, 2018). A leptina regula o apetite e o metabolismo inibindo a síntese e liberação de peptídeos orexígenos que estimulam o apetite, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AgRP) no núcleo arqueado (ARC) e ativa vias para suprimir o apetite por meio de peptídeos anorexígenos, como o produto da proopiomelanocortina (POMC), hormônio alfa-melanócito-estimulante (α -MSH) expresso no hipotálamo anterior, núcleo dorsomedial hipotalâmico (DMH), núcleo paraventricular (PVN), ARC e no núcleo do trato solitário do tronco cerebral (OBRADOVIC *et al.*, 2021).

Além de regular o apetite e peso corporal, a leptina também participa de adaptações neuroendócrinas ao jejum, reprodução e controle glicêmico (PAN; MYERS JR., 2018). Os altos níveis de leptina circulante encontrados em pessoas obesas apontam para uma resistência a esse hormônio, que tem como consequência a redução da saciedade, aumento no consumo de nutrientes e aumento do tecido adiposo (OBRADOVIC *et al.*, 2021).

A resistência a leptina pode ser associada a mutações em genes que codificam a leptina e seus receptores, visto que sua deficiência ou disfunção pode

afetar o metabolismo do indivíduo (WASIM *et al.*, 2016). Além disso, a ligação da leptina ao seu receptor ativa cascatas de sinalização intracelular, e alterações nessa sinalização podem interferir no funcionamento do receptor. Outra possibilidade, é a diminuição do transporte da leptina pela barreira hematoencefálica (BHE) (GRUZDEVA *et al.*, 2019), visto que para chegar ao cérebro esse hormônio precisa cruzar a BHE pelos seus transportadores específicos, e esses são afetados por mecanismos de saturação, onde o excesso de leptina produzida pelo tecido adiposo resulta em diminuição da permeabilidade da BHE, e conseqüentemente, uma menor quantidade de leptina chega ao cérebro, promovendo redução da via de sinalização para regulação do peso corporal (IZQUIERDO *et al.*, 2019).

Outro hormônio com papel importante na ingestão alimentar é a grelina, um hormônio produzido nas glândulas oxínticas do fundo gástrico e liberado em resposta ao jejum, estimulando a ingestão de alimentos e modulando o metabolismo sistêmico por meio da ativação de circuitos neurais orexígenos (FARHADIPOUR; DEPOORTERE, 2021). Os seus receptores estão localizados nos neurônios hipotalâmicos produtores de NPY/AgRP do ARC, os principais mediadores dos efeitos orexígenos da grelina (CABRAL *et al.*, 2014).

2.1.3 Obesidade e memória

A memória é um sistema complexo que permite a armazenagem e a recuperação de informações no cérebro e pode ser caracterizada pela forma como são adquiridas, podendo ser implícita ou explícita, ou pelo tempo que são armazenadas, onde são divididas em memória de curto prazo e de longo prazo (SOUSA; SALGADO, 2015).

A memória explícita, também chamada de declarativa, é o processamento neurocognitivo acompanhado pela consciência, onde são armazenados eventos e fatos, por exemplo (VOSS; PALLER, 2008). Sistemas de áreas interconectadas no cérebro são necessários para a aquisição desse tipo de memória, como o lobo temporal medial, com atenção para o hipocampo, visto que lesões nessa região afetam o estabelecimento de novas memórias explícitas (LOMBROSO, 2004). A memória implícita ou não declarativa é caracterizada pelo processamento neurocognitivo associado a memória adquirida de forma inconsciente, como por exemplo, tarefas e habilidades (VOSS; PALLER, 2008), sendo necessária a ativação

dos gânglios da base e circuitos associados para o seu funcionamento (LOMBROSO, 2004).

A obesidade vem sendo associada a déficit cognitivos, prejuízos à memória e um risco aumentado de demência no futuro, visto que afeta estruturas neurais centrais, como o hipocampo e circuitos frontoestriatais (LENTOOR, 2022). Essas alterações podem ser explicadas pelo impacto da inflamação e do estresse oxidativo proveniente da obesidade no cérebro, onde mediadores inflamatórios oriundos do tecido adiposo, como a leptina, atravessam a barreira hematoencefálica e impedem a plasticidade sináptica e a neurogênese no hipocampo, interferindo no processo de aprendizado, memória e cognição (SHALEV; ARBUCKLE, 2017). Zanini e colaboradores (2017) verificaram em seu trabalho que ratas alimentadas com uma dieta hipercalórica por 22 semanas apresentaram comprometimento da consolidação da memória declarativa de longo prazo, que pode ser associada ao ganho de peso induzido pela dieta e resistência à leptina. Na pesquisa de Bondan (2019) foi observado que ratos machos alimentados com dieta hipercalórica durante 60 dias mostraram prejuízos tanto na memória de curto como na de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos, sendo esse associado a uma resposta neuroinflamatória.

2.1.4 Obesidade, ansiedade e depressão

A ansiedade e a depressão são os transtornos mentais que mais atingem pessoas no mundo (OMS, 2017). A ansiedade é descrita como a “antecipação apreensiva de perigo ou desgraça futuras acompanhada por um sentimento de preocupação, sofrimento e/ou sintomas somáticos de tensão” (DSM-5, 2014, p. 818), já a depressão pode apresentar sintomas como “presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo” (DSM-5, 2014, p. 155), sendo a principal contribuinte para as mortes por suicídio por ano (OMS, 2017).

Processos inflamatórios têm sido implicados na fisiologia da depressão e da ansiedade, onde tanto a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) como do sistema nervoso autônomo atuam modulando os processos inflamatórios, promovendo o aumento das concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, como IL-6, TNF- α e proteína C-reativa (PCR) (RAISON *et al.*, 2013; MICHPOULOS *et al.*, 2017; BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020).

Esses transtornos mentais são intimamente relacionados a obesidade (PETRY *et al.*, 2008; BRUMPTON *et al.*, 2013), uma vez que a inflamação proveniente do tecido adiposo estimula a neuroinflamação que modifica a estruturas e a conectividade do circuito neural córtico límbico que controla o humor, a motivação e a emoção (FULTON *et al.*, 2022), mantendo o comportamento tipo ansioso e depressivo.

2.2 DIETA DE CAFETERIA

Modelos animais de dieta de cafeteria (CAF) fornecem uma ferramenta útil para estudo da obesidade e comorbidades associadas (PINI *et al.*, 2017). A dieta CAF consiste em alimentos humanos altamente energéticos, em conjunto com ração padrão, para desencadear obesidade induzida por dieta em animais (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Esses alimentos são altamente palatáveis e promovem um aumento no consumo por roedores devido ao seu elevado valor hedônico, levando a alterações nos sistemas neurais de alimentação e promovendo hiperfagia (LEIGH; LEE; MORRIS, 2018).

Esse comportamento hiperfágico é semelhante ao observado em humanos que consomem *junk food* (LALANZA; SNOEREN, 2021). Shafat, Murray e Rumsey (2009) verificaram em seu estudo que ratos alimentados com dieta de cafeteria exibiram hiperfagia desde o primeiro contato com a dieta e se tornaram obesos devido ao consumo da dieta variada rica em carboidratos e gordura.

2.3 MICROBIOTA E KEFIR

Microbiota humana é um termo usado para definir os trilhões de microrganismos que vivem no corpo. O principal local de colonização desses microrganismos é o trato gastrointestinal, onde há uma população diversificada com mais de 90% pertencente aos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes que interagem com o hospedeiro por meio do eixo intestino-cérebro através de vias imunes, neuroendócrinas e neurais, exercendo influência considerável sobre o comportamento (CRYAN *et al.*, 2019).

Kelly e colaboradores (2016) recrutaram pacientes com depressão e indivíduos saudáveis para sua pesquisa, onde foram realizadas diversas análises, incluindo o sequenciamento de RNAr 16S de suas fezes para avaliar a diversidade microbiana. Na sequência, realizaram o transplante de microbiota fecal (TMF) de pacientes deprimidos e controles para um modelo de rato deficiente em microbiota intestinal e observaram que o transplante induziu características comportamentais e fisiológicas da depressão nos animais, como comportamento tipo ansioso, anedonia e alterações no metabolismo de triptofano, demonstrando que a microbiota fecal pode desempenhar um papel no desenvolvimento da depressão, e que essa está associada à diminuição da riqueza e diversidade da microbiota intestinal. Zheng *et al.* (2016) verificaram em seu trabalho que camundongos *germ-free* apresentaram diminuição do tempo de imobilidade no teste de nado forçado quando comparado a camundongos criados convencionalmente. Eles também avaliaram as composições do microbiota de indivíduos depressivos e saudáveis e verificaram alterações na abundância de Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes.

Além do comportamento, estudos também apontam o papel da microbiota intestinal na regulação do metabolismo do hospedeiro, sendo essa associada ao desenvolvimento da obesidade e diabetes tipo 2 (ARON-WISNEWSKY *et al.*, 2021), onde estão envolvidos os efeitos de metabólitos microbianos no hospedeiro e a ativação do sistema imune inato (BOUTER *et al.*, 2017).

Ao longo da vida, a composição da microbiota intestinal pode ser modificada através do tipo de dieta ou pelo uso de medicamentos, como antibióticos. Estudos mostram que a ingestão de uma dieta rica em gordura modifica a microbiota intestinal, induzindo um processo inflamatório com um aumento da ativação de receptores Toll-Like 4 (TLR4), seguido por alterações no ambiente do hospedeiro e mudanças na disponibilidade de nutriente, que pode levar a disbiose intestinal (MYLES, 2014).

A ativação dos TLR4 altera as junções apertadas do intestino e aumenta a permeabilidade intestinal (KÖHLER; MCCORMICK; WALKER, 2003), esse receptor também é quem reconhece o lipopolissacarídeo plasmático derivado de bactérias intestinais (LPS) e promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 ou TNF- α (HAJJAR *et al.*, 2002). Cani e colaboradores (2007) alimentaram camundongos com uma dieta rica em gordura e esses animais apresentaram um aumento na concentração plasmática de LPS que foi suficiente para provocar aumento no peso corporal, hiperglicemia em jejum e inflamação, provavelmente pela ativação do

sistema imune inato. Dessa forma, é possível perceber que uma dieta do estilo ocidental pode modificar a microbiota intestinal e também contribuir com o processo inflamatório presente na obesidade.

Ao longo dos anos, a palavra “probiótico” teve vários significados. Foi definido por Parker (1974) como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Fuller (1989) mudou o foco para as culturas vivas utilizadas na fermentação de alimentos, tratando os probióticos como suplemento alimentar vivo que causa benéficos para o hospedeiro. Atualmente, eles são caracterizados como um grupo amplo de microrganismos que causam benefícios a um indivíduo quando ingeridos de maneira adequada (DINAN; QUIGLEY, 2011).

Entre os probióticos podemos citar o iogurte, leite acidófilo, kumis, coalhada e o kefir (WENDLING; WESCHENFER, 2013). O kefir é uma bebida láctea produzida pela ação de bactérias e leveduras agrupadas em uma matriz composta por proteínas e polissacarídeos, conhecida como grão de kefir (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014). Os grãos são brancos ou ligeiramente amarelos, sua aparência lembra couve-flor ou pipoca, tem forma irregular e tamanhos variados (KOŁAKOWSKI; OZIMKIEWICZ, 2012).

Nos grãos de kefir, há cerca de 30 espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras (KOLAKOWSKI; OZIMKIEWICZ, 2012). Dertli e Çon (2017) realizaram a identificação de cepas bacterianas em quatro grãos de kefir coletados em diferentes regiões e identificaram bactérias comuns entre eles, como *Lactobacillus kefiranofaciens*, além de *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* e *Pseudomonas spp.* Eles também encontraram cepas de leveduras, com a espécie *Saccharomyces cerevisiae* em todos os grãos. Pesquisas apontam vários benefícios deste probiótico para a saúde, como atividade anticancerígena, efeito hipocolesterolêmico, atividades antimicrobianas, cicatrização de feridas, atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de modular a composição intestinal (FARAG *et al.*, 2020) e melhorar o comportamento tipo ansioso e depressivo em animais (NOORI *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da suplementação com kefir no comportamento de ratos alimentados com dieta de cafeteria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se a ingestão de kefir interfere no ganho de peso corporal ou no consumo alimentar.
- Verificar se a suplementação com kefir, combinada ou não com a dieta de cafeteria, pode influenciar nos comportamentos tipo ansioso e depressivo, e também na memória de curto prazo dos animais.
- Avaliar a diversidade microbiana presente no kefir por meio do BOX-PCR *Fingerprinting*.
- Analisar se o probiótico interfere nas concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos e colesterol e em suas alterações provocadas pela obesidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

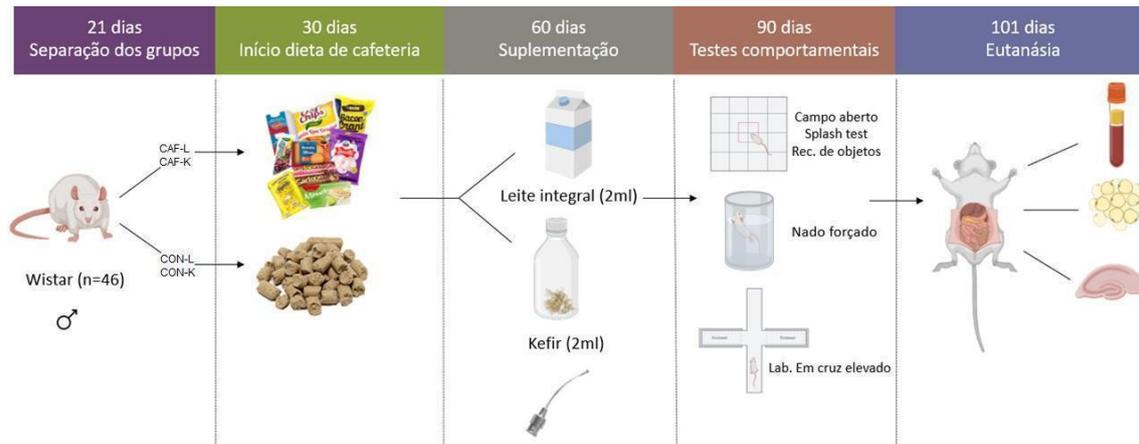
Foram utilizados 46 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidas do Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram mantidos no NAEVI-UEPG em caixas para roedores, com cama de maravalha, em condições de temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com luminosidade em ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial, água e/ou dieta de cafeteria à vontade.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEPG (processo CEUA: 0575718/2021 – ANEXO A).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais, obtidos aos 21 dias de vida, foram separados em quatro grupos, nomeados de acordo com a alimentação e com a suplementação: ração - leite (CON-L); ração - kefir (CON-K); dieta CAF - leite (CAF-L); dieta CAF - kefir (CAF-K). Com 30 dias os ratos dos grupos dieta começaram a receber a dieta CAF contendo alimentos ultraprocessados, mantendo ração padrão e água. Aos 60 dias iniciamos a suplementação com 2 ml de kefir ou leite por gavagem, com 90 dias foram iniciados os testes comportamentais com duração de oito dias, sendo realizado um diferente por dia. Por meio de decapitação com guilhotina, os animais foram sacrificados com 101 dias de vida e coletado o sangue, que na sequência foi centrifugado e armazenado em tubos de microcentrífuga a -20°C para posterior quantificação de colesterol, triglicérides e glicose com uso de kits enzimáticos colorimétricos. As gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal foram retiradas, pesadas em balança de precisão e descartadas. Resumo do delineamento experimental na figura abaixo (figura 01).

Figura 01 – Desenho experimental



Fonte: A autora

4.3 DIETA DE CAFETERIA

Ao completarem 30 dias de vida, os animais pertencentes aos grupos CAF-L e CAF-K começaram a receber a dieta de cafeteria *ad libitum*. A dieta padrão era uma ração comercial para roedores (Nuvilab CR1, Quimtia S/A). A dieta de cafeteria utilizada para induzir a obesidade era composta por uma combinação de alimentos ultraprocessados, dieta padrão, suco industrializado de uva (Purity) e água. Os alimentos ultraprocessados oferecidos aos ratos consistiram em presunto cozido (Frimesa), marshmallow (Docile Alimentos), salgadinhos de bacon (Bacon Crant), salgadinhos de queijo (Cegonha Alimentos), biscoito Maria (Renata), biscoito wafer limão (Minueto), bolacha recheada de morango e de chocolate (Cartoon - Parati) e batata lisa (Chef chips). Com esses alimentos foram elaborados três cardápios com três ingredientes cada (tabela 01), combinando produtos doces e salgados. A troca de dieta era realizada toda segunda, quarta e sexta-feira e as porções foram ofertadas de acordo com o consumo através de um controle de ingestão por pesagem. As informações nutricionais dos alimentos foram elaboradas a partir da rotulagem nutricional presente na embalagem dos alimentos. As informações nutricionais da ração comercial para roedores Nuvilab CR1 foram adaptadas do artigo de Rocha-Gomes e colaboradores (2020).

O protocolo utilizado seguiu as recomendações de Lanza e Snoeren (2021), onde a dieta deve ter sabores, nutrientes e texturas variadas, cardápios diferentes, acesso *ad libitum* e também a oferta de ração padrão, visto que a escolha do animal pelo ingrediente deve ser por sua palatabilidade. Além disso, os autores apontam em

sua revisão que devido a sua alta validade de construto a dieta de cafeteria é um bom modelo para mimetizar padrões problemáticos da alimentação humana e pode levar a alterações comportamentais.

Tabela 01 - Informações nutricionais dos alimentos que compõem dieta de cafeteria

Cardápio	Alimentos	Kcal/g	Carboidrato (g)	Proteínas (g)	Gorduras totais (g)	Sódio (mg)
A	Salgadinho queijo	5,40	0,48	0,06	0,36	7,84
	Bolacha rec. morango	4,23	0,67	0,05	0,15	2,70
	Marshmallow	3,05	0,75	0,05	-	0,45
Kcal final/g		16,55				
B	Presunto	1,73	0,05	0,13	0,11	9
	Wafer limão	5,23	0,60	0,04	0,30	1,87
	Salgadinho bacon	4,80	0,56	0,11	0,23	6,40
Kcal final/g		15,63				
C	Batata frita	5,64	0,48	0,06	0,23	5,16
	Biscoito maria	4	0,80	0,09	0,06	3,27
	Bolacha rec. chocolate	4,23	0,67	0,06	0,15	2,50
Kcal final/g		17,74				
A, B e C	Ração (Nuvilab CR1)	3,43	0,49	0,21	0,07	0
	Suco industrializado de uva	0,44 kcal/ml	0,11	-	-	0,07

Fonte: A autora.

4.4 PREPARO E SUPLEMENTAÇÃO COM O KEFIR

Os grãos de kefir foram doados pela Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Eles foram ativados adicionando 5 g de grãos a 100 ml de leite integral (Naturalle) e incubado a 25°C por 24 h (GAO *et al.*, 2019). Os grãos foram recuperados por peneiramento e então reinoculados em leite fresco e incubados a 25°C por 24 h. Dessa forma, foram considerados ativos e utilizados ao longo deste estudo.

Após cada processo de fermentação, os grãos eram separados do leite fermentado por peneiramento, lavados em água destilada e conservados em leite a 4°C para uso posterior (IRIGOYEN *et al.*, 2005). Durante o período de 4 semanas (dia 60 até 90 de vida), o grupo CON-K e CAF-K receberam 2 ml de kefir por gavagem diariamente. Os grupos CON-L e CAF-L receberam uma quantidade equivalente de leite.

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Aos 91 dias de vida, os ratos foram submetidos a teste comportamentais para avaliar o comportamento do tipo ansioso, tipo depressivo, atividade locomotora e a memória de reconhecimento. Os testes foram realizados em dias diferentes, ordenando também os testes mais estressantes para os animais por último, totalizando 8 dias consecutivos na seguinte ordem: Labirinto em cruz elevado, campo aberto, dois dias de habituação, *splash test*, treino de nado forçado e teste de nado forçado. O transporte dos animais do biotério até a sala de experimentos causa alterações fisiológicas devido ao estresse do transporte e pode ter reflexos nos dados da pesquisa (OBERNIER; BALDWIN, 2006), por esse motivo os animais foram habituados à sala de experimento por 1 h antes de iniciar o respectivo teste comportamental (DIETZE *et al.*, 2016) que ocorreram com intervalo de 24 horas, sendo realizados entre 13h e 15h. Os testes foram registrados por meio de filmagem com dois celulares da marca Nokia Lumia Denim modelo 2014 e os testes sempre realizados pelas mesmas experimentadoras.

4.5.1 Labirinto em cruz elevado

Os roedores possuem uma aversão natural a espaços abertos, o labirinto em cruz elevado (LCE) se fundamenta no conflito dos animais entre a sua motivação inata para explorar novos ambientes e essa aversão, sendo o aparato considerado um modelo de conflito comportamental espontâneo (BOURIN, 2015). A avaliação do

comportamento ansioso utiliza a razão entre o tempo gasto nos braços abertos e o tempo gasto nos braços fechados. O aumento no tempo do braço aberto e/ou entradas nos braços abertos demonstra um efeito ansiolítico, entradas totais e/ou nos braços fechados podem ser medidas para avaliar a atividade motora espontânea dos animais (WALF; CHERYL, 2007).

O LCE possui 50 cm de altura do chão e é composto por dois braços abertos e dois braços fechados com paredes laterais, ambos opostos, formando uma cruz. Nesse teste os animais foram colocados no centro, de frente para um braço aberto, e as entradas/duração em cada braço são registradas por vídeo durante 5 minutos, sendo um método simples para avaliar as respostas de ansiedade dos animais. Antes do início de cada teste, o LCE foi higienizado com álcool 5%.

4.5.2 Campo aberto

Através do teste de campo aberto é possível avaliar a capacidade ambulatorial dos animais e também pode ser usado para avaliar o comportamento tipo ansioso (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). As alterações na locomoção dos ratos podem indicar anormalidades da função cerebral, sendo associadas a distúrbios neurológicos, dessa forma espera-se que a distância ambulatorial total seja semelhante entre eles (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019).

O campo aberto (CA) consiste em uma arena quadrada iluminada, de 1m², com bordas de 40 cm de altura, para que o animal não escape, dividida em 25 quadrados (20 x 20 cm). Para realização do teste, o rato foi colocado no centro do aparato e seu comportamento foi registrado por meio de gravação de vídeo durante cinco minutos e analisados o número de linhas cruzadas (locomoção horizontal), exploração vertical (*rearing*) e tempo no centro (PRUT; BELZUNG, 2003). A arena foi limpa antes de cada teste com álcool 5%.

4.5.3 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objeto é baseado na tendência espontânea dos roedores de passar mais tempo explorando um objeto novo do que um familiar, sendo esse experimento constituído por três fases: habituação, familiarização e fase de teste

(ANTUNES; BIALA, 2012). Nessa pesquisa, foram destinados três dias para a habituação e um dia para a familiarização e teste propriamente dito, os procedimentos foram adaptados de Ennaceur e Delacour (1988).

No período de habituação o animal foi colocado no centro do aparato e permaneceu nele por cinco minutos sem a presença de nenhum objeto. No 4º dia, o teste foi realizado em dois momentos:

1ª) Fase de familiarização: Foram colocados dois objetos idênticos na arena, duas caixas triangulares vermelhas de plástico, cada qual estando em um dos lados da caixa a uma distância aproximada de 10 cm das paredes. O animal foi colocado no centro e teve cinco minutos para explorar os objetos, após esse tempo retornou para sua caixa.

2ª) Fase de teste: Após 30 minutos da fase de familiarização, uma das caixas vermelhas utilizadas no primeiro período de investigação foi substituída por um novo objeto, uma garrafa de vidro marrom de modelo diferente da caixa vermelha. O animal teve novamente cinco minutos para explorar o velho e o novo objeto.

A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz ou as patas dianteiras (ZANINI *et al.*, 2017). O tempo gasto na exploração de cada objeto foi contado em segundos e para a análise dos dados foi utilizado o índice de reconhecimento (IR), calculado pelo tempo gasto na exploração do objeto novo (b) dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos (b + a), sendo calculado pela seguinte fórmula:

$$IR = \frac{b}{b + a} \quad (01)$$

O valor de IR acima de 0,5 indica que o animal interage mais tempo com o objeto novo do que com o familiar (BEVINS; BESHEER, 2006).

A familiarização e a fase de teste foram registradas por meio de vídeo durante cinco minutos. A arena foi higienizada com álcool 5% antes de cada teste.

4.5.4 *Splash test*

O *splash test* tem como papel avaliar déficits motivacionais e dificuldades de autocuidado em roedores (NOURI *et al.*, 2020). Para realização do teste foi utilizado o mesmo aparato do CA, onde o animal foi colocado no centro e borrifada uma solução

de sacarose a 10% no seu dorso. Devido a viscosidade, a solução gruda no pelo do animal e ele tende a iniciar o comportamento de autolimpeza (em inglês *grooming*) (ISINGRINI *et al.*, 2010). Foram registrados por cinco minutos o tempo total gasto na limpeza e a latência para a primeira limpeza (LEFTER *et al.*, 2020). Animais com sintomas depressivos são caracterizados por um aumento no tempo de latência e diminuição do tempo gasto na limpeza (D'AUDIFFRET *et al.*, 2010). O comportamento de autolimpeza incluiu a limpeza do rosto/focinho, limpeza da cabeça (movimentos semicirculares sobre o topo da cabeça e atrás das orelhas), limpeza do corpo (lambendo e coçando o corpo com as patas traseiras), lamber as pernas e a cauda/genitais (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004).

4.5.5 Nado forçado

O teste de nado forçado é um teste comportamental usado para o estudo do comportamento do tipo depressivo em roedores. É comumente utilizado para a avaliação de drogas antidepressivas e eficácia de novos compostos para prevenir estados depressivos (CAN *et al.*, 2012). Para realização desse teste é utilizado um cilindro de PVC com 50 cm de altura e 20 cm, onde 2/3 do cilindro é completado com água (22 ± 2 °C). Seguindo o protocolo de Yankelevitch-Yahav e colaboradores (2015), o teste é dividido em duas sessões, com intervalo de 24h. Na primeira, chamada de pré-teste, os animais permaneceram no cilindro com água por um período de 15 minutos. Na segunda, realização do teste propriamente dito, os animais permaneceram nos cilindros por cinco minutos. Após passagem do tempo, com o uso de toalhas, os animais são retirados e secos pelas experimentadoras e devolvidos às suas respectivas caixas. O experimento foi realizado com quatro ratos por vez, em cilindro distintos, com a identificação do animal para posterior análise da filmagem. A água foi trocada a cada rodada de testes para evitar qualquer interferência no próximo rato.

A tendência dos animais quando colocados no cilindro é tentar escapar, no entanto, após um tempo ele cessam a sua atividade e exibem um comportamento de imobilidade, apresentando apenas movimentos para manter a cabeça fora da água, sendo o maior tempo de imobilidade associado com o comportamento de desesperança (CARTER; SHIEH, 2015). Nesse teste foram quantificados em segundos o comportamento de imobilidade, natação e escalada. A natação foi

considerada quando o animal realizava movimentos horizontais, escalada caracterizada por movimentos verticais de fuga e a imobilidade quando o rato flutuava passivamente, realizando apenas os movimentos para manter a cabeça fora da água (ÁLVAREZ-SUÁREZ *et al.*, 2015).

4.6 DADOS BIOMÉTRICOS

Os animais foram pesados individualmente uma vez na semana, desde os 21 dias de vida, para obtenção de evolução de peso corporal. A pesagem ocorreu na balança de precisão da marca BEL Engineering.

Ao completarem 101 dias de vida, os animais foram privados de alimento por 12 horas e sacrificados através de decapitação rápida por guilhotina. Após a decapitação, o corpo e a cabeça do rato foram posicionados ao lado de uma régua para obtenção do comprimento naso-anal, para cálculo do índice de Lee, seguindo a seguinte fórmula (NERY *et al.*, 2011):

$$\text{Índice de Lee} = \left(\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{comprimento naso - anal (cm)}} \right) \times 1000 \quad (02)$$

Na sequência foi realizada uma laparotomia e a gordura retroperitoneal, perigonadal e mesentérica foram individualizadas e pesadas para calcular a porcentagem do seu peso em relação ao peso corporal total (MALAFAIA *et al.*, 2013).

Os cérebros foram removidos rapidamente e feita a dissecação do hipocampo em gelo, na sequência, a estrutura foi pesada em balança de precisão e armazenadas a -80 °C para posterior análise, visando realizar a quantificação neuroquímica de serotonina por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (MIKAIL *et al.*, 2012.).

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a eutanásia, o sangue foi coletado em tubos estéreis e imediatamente centrifugado a 5000g por 10 minutos. Amostras de plasma obtidas por centrifugação foram usadas para quantificação de glicose, triglicerídeos e colesterol total.

Forma utilizados kits enzimáticos colorimétricos doados pela empresa Quibasa-Bioclín: GLICOSE BIOCLIN KIT 2X250 mL, para dosagem de glicose; COLESTEROL BIOCLIN KIT 2X100 mL, para dosagem de colesterol total; TRIGLICÉRIDES BIOCLIN KIT 2X100 mL, para dosagem de triglicérides

Para a realização das análises, 10ul de plasma sanguíneo foram pipetadas em microplacas, e em seguida adicionado 1 ml de reagente. Na sequência, foram deixadas por 10 minutos em estufa a 37°C. Foram realizadas as leituras a 520 nm no espectrofotômetro Biotek. A concentração de glicose, colesterol e triglicérides foi determinada através dos seguintes cálculos indicados nos protocolos dos kits:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 100}{\text{Absorbância do Padrão}} \quad (03)$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 200 \quad (04)$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 100}{\text{Absorbância do Padrão}} \quad (05)$$

4.8 BOX-PCR FINGERPRINTING

Para a realização da caracterização, um grama de kefir foi homogeneizado em nove mililitros de diluente PBS estéril (Cloreto de Sódio 8 g/L, Cloreto de Potássio 0,2g/L, Fosfato de Sódio Dibásico 1,15g/L, Fosfato Monopotássico 0,2g/L) (1:10 m/v). As concentrações de células viáveis nas suspensões foram obtidas por diluição seriada de 10^{-3} nos meios seletivos.

Os meios utilizados neste estudo incluíram o ágar MRS (Man Rogosa e Sharpe) (Peptona 10g/L, Extrato de Carne 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L, Dextrose 20g/L, Polisorbato 80 1g/L, Citrato de Amônio 2g/L, Acetato de Sódio 5g/L, Sulfato de Magnésio 0,1 g/L, Sulfato de Manganês 0,05 g/L, Fosfato Monopotássico 2 g/L, Ágar 15g/L) e ágar BHI (Infusão Cérebro-coração) (Infusão Cérebro-Coração 17 g/L, Peptona 10 g/L, Glicose 2 g/L, Cloreto de Sódio 5g/L, Fosfato Dissódico 2,5g/L, Ágar 15g/L). Sendo o primeiro específico para o crescimento Lactobacilos e o segundo para contagem global de bactérias, ambos usados em estudos que buscaram caracterizar microrganismos presentes no kefir (SIMOVA *et al.*, 2002; BERGMANN *et al.*, 2010).

O volume de 0,1 ml da solução resultante foi espalhada em placas de Petri contendo os meios de cultura. As placas foram incubadas em estufa de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 120h para MRS e 48h para BHI, tempo necessário para o surgimento das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Após o surgimento das UFC, os microrganismos com características macroscópicas distintas a olho nu foram submetidos a técnica de semeadura em esgotamento de alça em seus respectivos meios e incubados em estufa de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 120h para MRS e 48h para BHI, ou até crescimento e comprovação do isolamento sem presença de contaminante externo. Por esse método foram isoladas 19 colônias distintas.

As colônias resultantes foram submetidas ao processo de Coloração de Gram, processo que visa separar as bactérias grupos com base na morfologia celular e na estrutura da parede celular: Gram-positivas e Gram-negativas (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009). O protocolo utilizado consistiu em realizar o esfregaço das bactérias em lâmina de vidro, fixação pelo calor e exposição aos corantes cristal violeta (60 segundos), lugol (60 segundos) e fucsina (30 segundos) (MOREIRA *et al.*, 2015). Após completa secagem as amostras foram observadas em microscópio nas objetivas de 40X e 100X para diferenciação de Gram e comprovação de isolamento por análise de morfologia.

As cepas bacterianas foram isoladas, e de acordo com a afinidade com o seu respectivo meio, crescidas em caldo MRS e caldo BHI e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em agitação orbital por aproximadamente 120h. Os cultivos foram centrifugados a 8.000xg durante 10 minutos, e os pellets sobrenadantes foram diluídos em 1 ml de tampão PBS e encaminhadas para extração de DNA total.

O DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante e a confirmação da integridade da amostra se deu a partir de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com solução de brometo de etídio 0,00005% e observado sob luz violeta. Após confirmação da extração, as amostras seguiram para a amplificação por PCR, fazendo uso do iniciador BOX-A1R, seguindo o ciclo de termociclador: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 45s, extensão a 72°C por 2min e um ciclo final de extensão por 10 min a 72°C (ROVIDA *et al.*, 2021). Para verificação da amplificação, as amostras passaram por processo de eletroforese em gel de agarose 1,5% por aproximadamente 5h, para a separação eficaz das bandas. Logo depois o gel foi

corado em solução contendo SYBR Gold na concentração de 2X, visualizado sob luz ultravioleta e documentado em foto.

A foto do BOX-PCR foi analisada pelo programa Bionumerics para identificação de bandas, construindo-se, posteriormente um dendrograma de similaridade a partir da aplicação do algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean), estabelecendo-se o coeficiente de Jaccard com 3% de tolerância (PAULITSCH, 2021). Foi estabelecido que amostras com padrão de similaridade igual ou acima de 70% são sugestivas de clones.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para o número (n) de ratos citados nas legendas das figuras e tabelas. Os dados foram analisados pelo teste de distribuição de normalidade de Shapiro-Wilk. Os parâmetros biométricos, bioquímicos e comportamentais foram submetidos a testes paramétricos (one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn) usando GraphPad Prism versão 9.3.1 para Windows (San Diego). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. E para os dados obtidos a partir do registro semanal de ganho de peso corporal (g), consumo alimentar (g), ingestão calórica (kcal), os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguidas de pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 EVOLUÇÃO DE PESO AO LONGO DAS SEMANAS

A ANOVA de duas vias indicou haver aumento do peso corporal ao longo das semanas ($F(10,462) = 1134, p < 0,0001$) e entre os grupos ($F(3,462) = 17,50, p < 0,0001$). O pós-teste de Tukey mostrou um ganho de peso significativo ($p < 0,05$) do grupo CAF-L em relação ao grupo CON-K na 10^a e 11^a semana de experimento. Diferenças no ganho de peso apareceram também na 11^a semana, com o grupo CAF-L ganhando mais peso em relação ao grupo CON-L ($p < 0,05$). De modo geral, é possível observar que os grupos alimentados com dieta CAF tiveram um maior ganho de peso em relação aos grupos controle (figura 02).

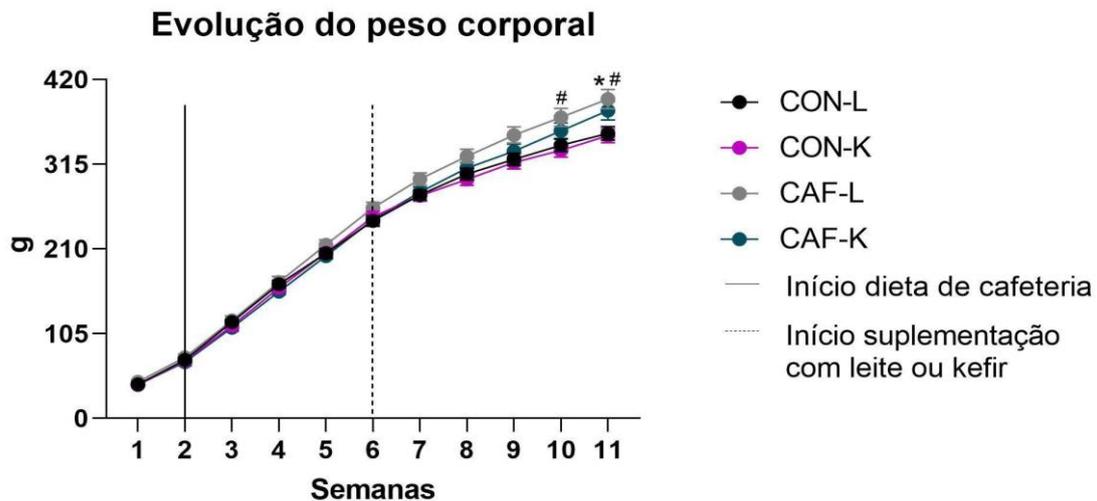


Figura 02 – Evolução do peso corporal ao longo do experimento. Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-L; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-K (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.2 SOMA DAS GORDURAS CORPORAIS

Na figura 03, está apresentada a soma dos estoques de gordura total, ou seja, a soma das três gorduras removidas, perigonadal, retroperitoneal e mesentérica, em relação ao peso corporal final. A ANOVA de uma via mostrou diferença entre os grupos ($F(3,42) = 25,46$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo CON-L em relação ao CAF-L e CAF-K, e também, do CON-K em relação aos grupos CAF-K e CAF-L. Esses dados mostram que os grupos alimentados com dieta de cafeteria tiveram um acúmulo maior de gordura em relação aos grupos controles.

Soma das gorduras corporais

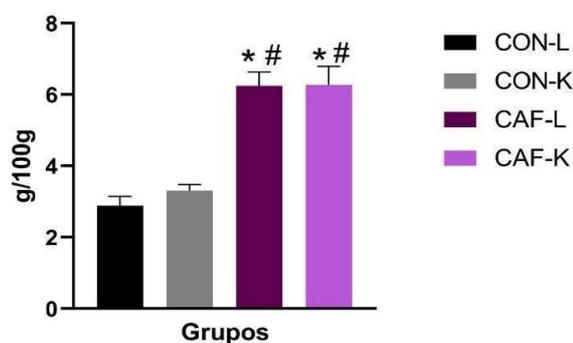


Figura 03 - Soma das gorduras corporais (g/100g) dos ratos. Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * $p < 0,05$ em relação ao

grupo CON-L; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-K (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.3 GORDURA PERIGONADAL, RETROPERITONEAL E MESENTÉRICA

As figuras 04 (a, b e c) apresentam o peso individual das gorduras que foram somadas para obtenção do peso total das gorduras. A gordura perigonadal ($F(3,42) = 14,98$, $p < 0,0001$), retroperitoneal ($F(3,42) = 26,36$, $p < 0,0001$) e mesentérica ($F(3,42) = 12,14$, $p < 0,0001$) apresentaram diferenças significativas no teste estatístico ANOVA. Da mesma forma que na soma das gorduras, o pós-teste de Tukey encontrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo CON-L em relação ao CAF-L e CAF-K, e também, do CON-K em relação aos grupos CAF-K e CAF-L nas três gorduras. Esses resultados mostram que os animais alimentados com dieta CAF tiveram um maior estoque de gorduras onde os animais alimentados com a dieta de cafeteria tiveram um maior estoque de gorduras perigonadal, retroperitoneal e mesentérica quando comparado com os grupos alimentados com ração padrão, independente da suplementação com kefir ou leite.

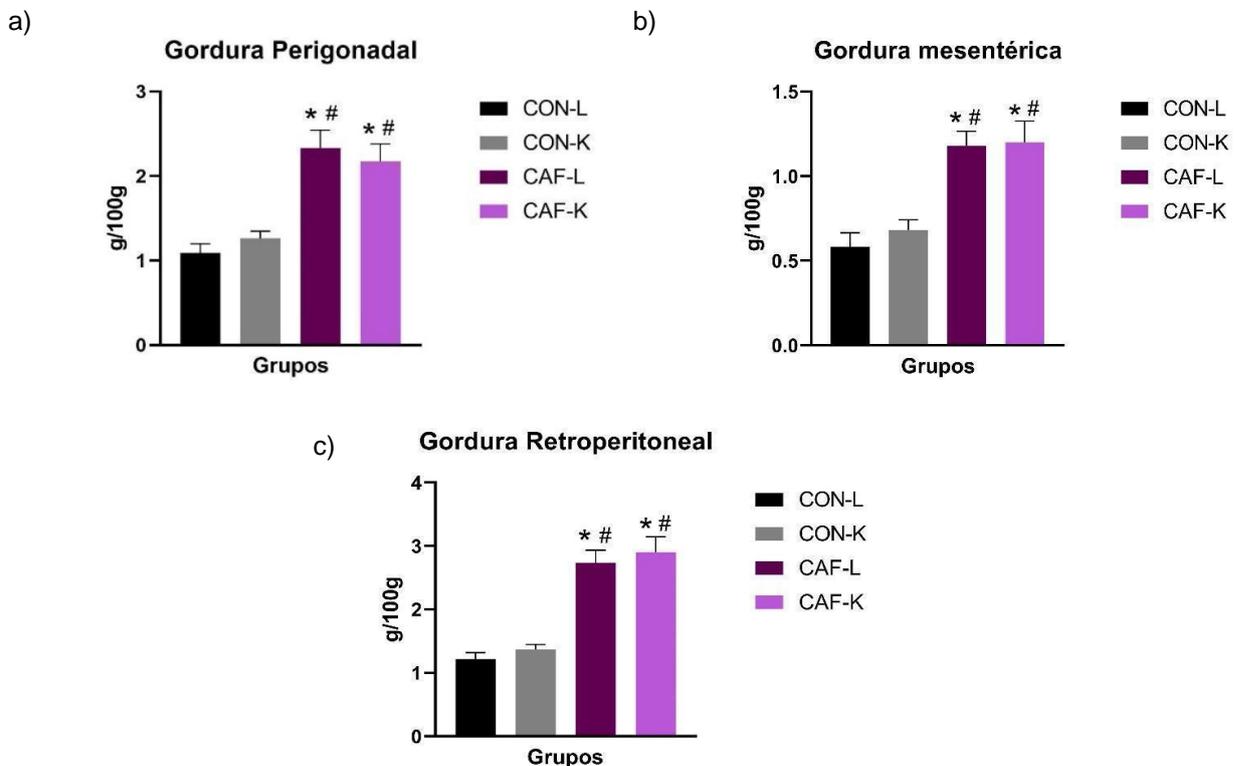


Figura 04 - Gordura perigonadal (a), mesentérica (b) e retroperitoneal (c) (g/100g). Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-L; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-K (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.4 ÍNDICE DE LEE

A figura 05 mostra os resultados do cálculo do índice de Lee. A ANOVA de uma via indicou haver diferenças entre os grupos ($F(3,42) = 3,221$, $p=0,0321$). O pós-teste de Tukey apontou diferenças significativas entre os grupos CON-L e CAF-L ($p=0,0437$), indicando o desenvolvimento da obesidade do grupo CAF-L em relação ao CON-L.

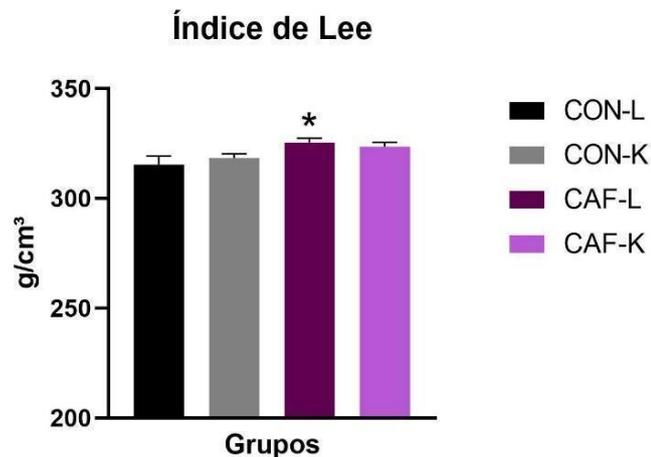


Figura 05 – Índice de Lee (g/cm^3). Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L ($n = 11$), CAF-L ($n = 11$), CON-K ($n = 12$) e CAF-K ($n = 12$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-L (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.5 INGESTÃO CALÓRICA POR SEMANA

Na figura 06 é possível observar a ingestão calórica dos animais ao longo das 11 semanas de experimento. A ANOVA de duas vias mostrou haver diferenças ao longo das semanas ($F(3,132) = 66,35$, $p < 0,05$) e também entre os grupos ($F(10,132) = 88,05$, $p < 0,05$). O pós-teste de Tukey apontou que a partir da 8ª semana até a 11ª o grupo CAF-L e CAF-K apresentaram uma maior ingestão calórica em relação ao grupo CON-K ($p < 0,05$). Na 9ª e 10ª semana os grupos CAF-L e CAF-K tiveram também uma maior ingestão calórica em relação ao grupo CON-L ($p < 0,05$), no entanto, essa diferença desaparece na 11ª semana.

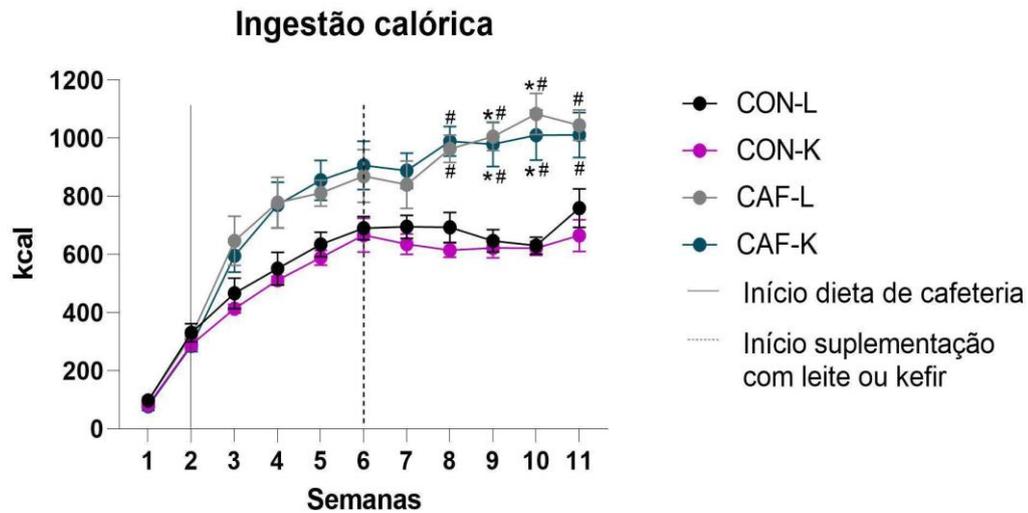


Figura 06 – Ingestão calórica (kcal) dos ratos ao longo do experimento. Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * p<0,05 em relação ao grupo CON-L; # p<0,05 em relação ao grupo CON-K (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.6 CONSUMO ALIMENTAR

Na figura 07 é possível observar o consumo alimentar dos animais ao longo das 11 semanas de experimento. A ANOVA de duas vias mostrou haver diferenças ao longo das semanas ($F(3,132) = 53,95$, $p < 0,05$) e também entre os grupos ($F(3,132) = 117,4$, $p < 0,05$). O pós-teste de Tukey apontou um aumento no consumo dos grupos alimentados com dieta CAF em relação ao CON-K na 2^a, 4^a, 7^a, 8^a, 9^a e 11^a ($p < 0,05$). O aumento do consumo alimentar também foi maior no grupo CAF-L em comparação ao grupo CON-L na 4^a, 7^a ($p < 0,05$). E na semana 8, 10 e 11 o grupo CON-L se manteve diferente do grupo CAF-L e se mostrou diferente também do grupo CAF-K ($p < 0,05$). Não apareceram diferenças entre os grupos CON-L e CON-K, o probiótico kefir não foi capaz de diminuir o consumo de ração entre esses grupos.

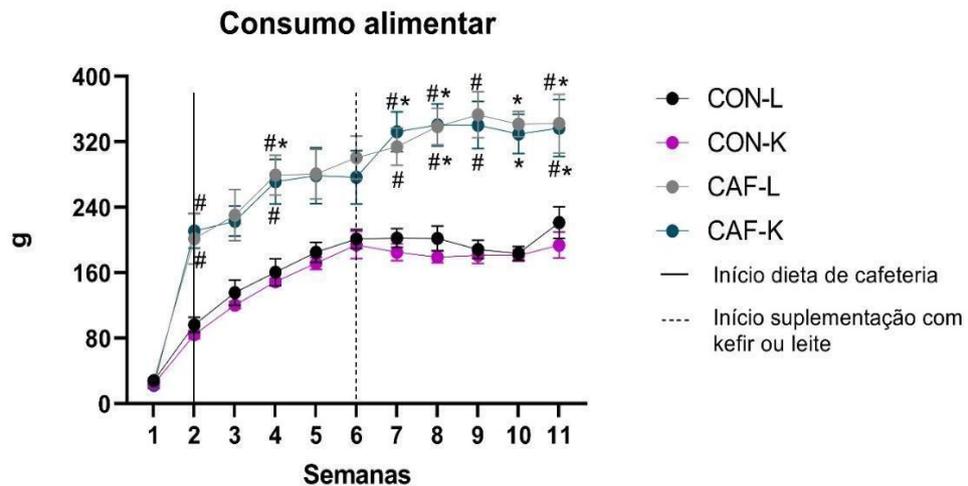


Figura 07 – Ingestão de alimento (g) dos ratos ao longo do experimento. Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-L; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-K (ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey).

5.7 GLICOSE, COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS

Os dados referentes às concentrações de glicose plasmática não apresentaram distribuição normal e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Esse mostrou haver diferença entre os grupos ($p = 0,0022$) e com a realização do pós-teste de Dunn foi possível verificar que a concentração de glicose do grupo CON-L e do grupo CON-K foram menores do que a concentração do grupo CAF-L (figura 08) ($p < 0,05$), indicando que a dieta de cafeteria foi capaz de provocar o aumento da glicemia em relação aos animais controle.

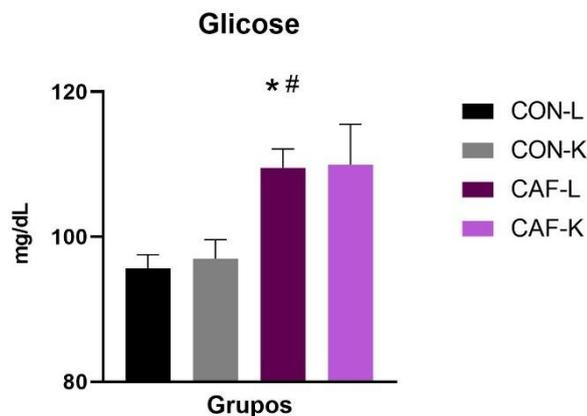


Figura 08 – Concentração plasmática de glicose (mg/dL). Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-L; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON-K (Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn).

Os dados de colesterol (figura 09 – a) e triglicerídeos (figura 09 – b) apresentaram distribuição normal e foi realizado a ANOVA de uma via, que não apontou diferença em nenhuma das duas análises bioquímicas ($p > 0,05$), não havendo alterações nas concentrações plasmáticas dos animais.

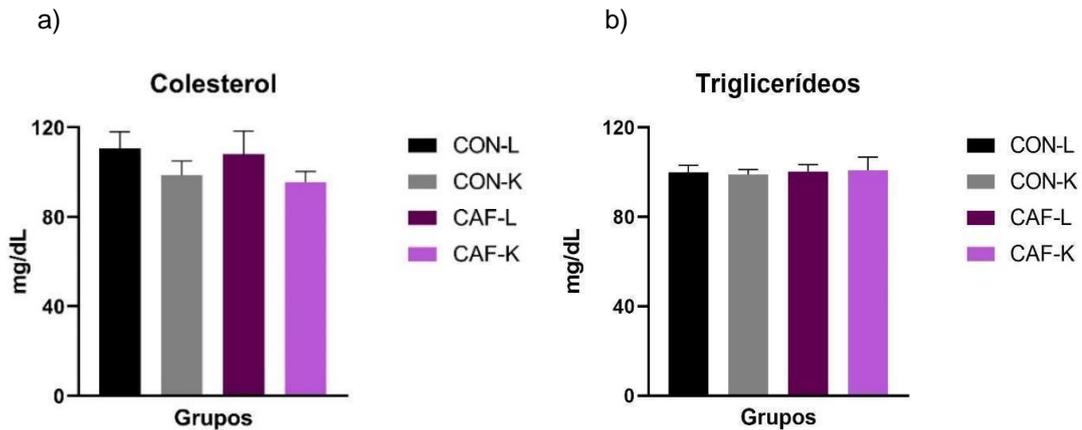


Figura 09. Concentrações plasmáticas de colesterol (A) e triglicerídeos (B) (mg/dL). Os valores são apresentados como média \pm EPM. CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via.

5.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.8.1 Labirinto em cruz elevado

O software utilizado identificou outliers, esses foram removidos e, por esse motivo, o grupo CON-L possui 10 animais.

Os dados do tempo no braço aberto do LCE não apresentaram distribuição normal e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Esse mostrou haver diferença entre os grupos ($p = 0,0483$). Na sequência, o pós-teste de Dunn apontou diferença significativa entre os grupos CON-K e CAF-L ($p = 0,0364$ (figura 10)).

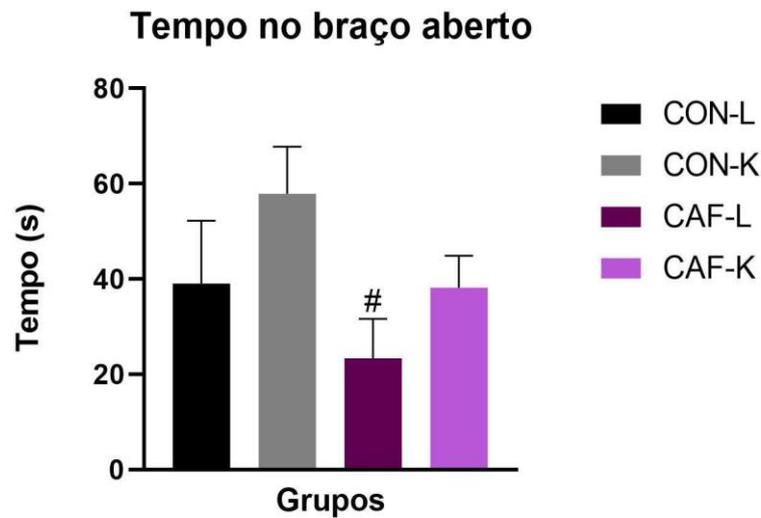


Figura 10 – Tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 10), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). # indica que os ratos CAF-L eram diferentes do CON-K (Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

O número de entradas nos braços fechados podem ser uma medida para avaliar a atividade motora espontânea dos animais. Dessa forma, foi realizada a ANOVA de uma via para avaliar essa diferença. O teste estatístico não mostrou diferença entre os grupos ($F(3,42) = 0,7402$, $p = 0,5342$) (figura 11).

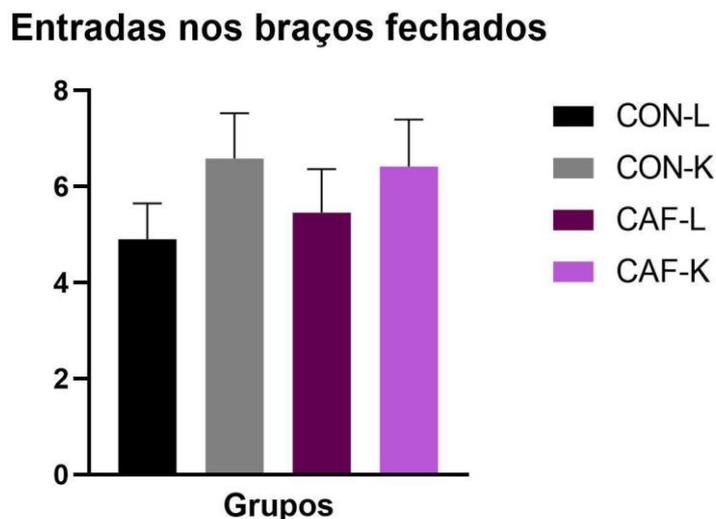


Figura 11 – Número de entradas no braço fechado. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 10), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

5.8.2 Campo aberto

A figura 12 mostra o número total de cruzamentos realizados pelos animais no teste de campo aberto, que visa avaliar a atividade locomotora. O teste ANOVA de uma via apontou não haver diferença entre os grupos ($F(3,42) = 1,088$; $p=0,3648$), sendo esse o resultado esperado, pois mostra que os animais não possuem atividade motora comprometida.

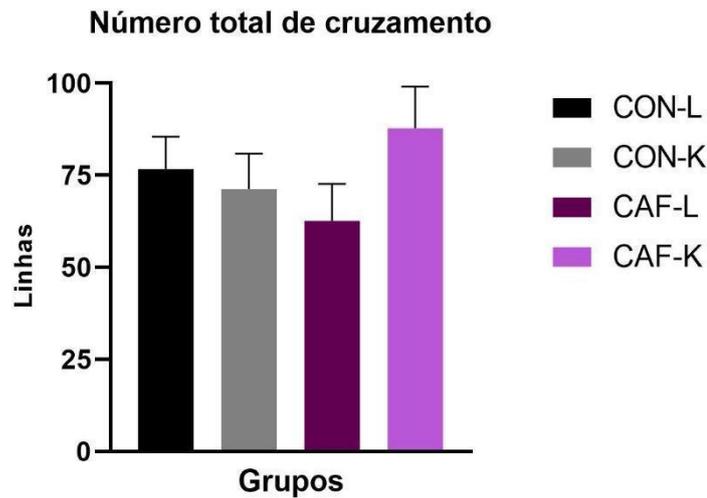


Figura 12 – Número total de linhas cruzadas no CA. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L ($n = 11$), CAF-L ($n = 11$), CON-K ($n = 12$) e CAF-K ($n = 12$). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

A figura 13 mostra o número de vezes que os animais realizaram a exploração vertical (*rearing*), no campo aberto. O teste ANOVA de uma via não apresentou diferenças entre os grupos ($F(3,42) = 1,608$, $p < 0,2017$).

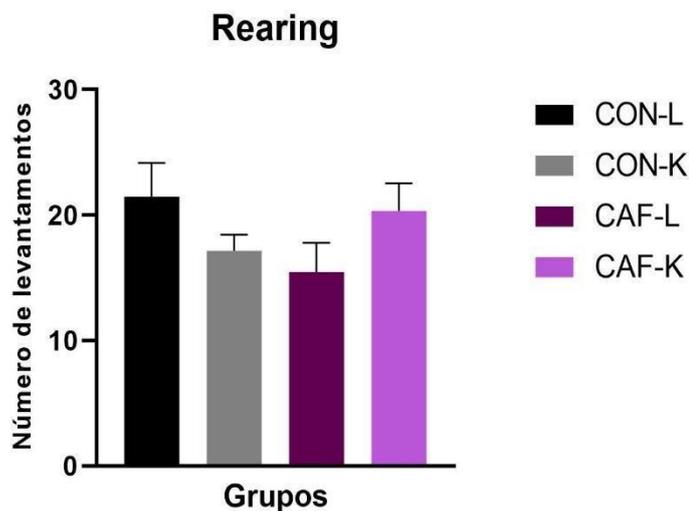


Figura 13 – Número de levantamentos no CA. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

5.8.3 Reconhecimento de objetos

A figura 14 mostra os resultados do índice de reconhecimento de objetos, que visa avaliar a memória de curto prazo dos animais, a sua tendência espontânea de explorar um objeto novo em relação a um já conhecido. Foi realizada a ANOVA de uma via que não identificou diferenças significativas entre os grupos ($F(3,42) = 0,2886$, $p=0,8334$).

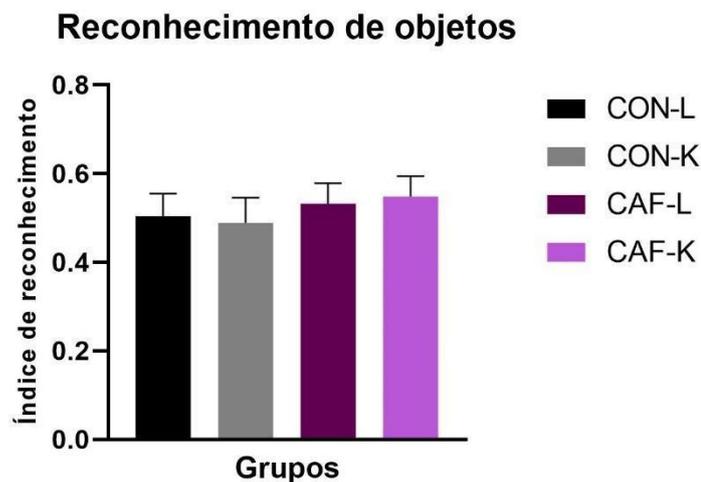


Figura 14 – Índice de reconhecimento de objetos. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 12) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

5.8.4 *Splash test*

O software utilizado identificou outliers, esses foram removidos e, por esse motivo, o grupo CON-K possui 11 animais.

A figura 15 apresenta o tempo que os ratos demoraram para começar a se limpar da solução com sacarose esguichada. A ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os grupos ($F(3,41) = 0,5623$; $p=0,6430$). Assim como não mostrou haver diferença no tempo que os animais se limpam após o esguicho ($F(3,42) = 1,1522$; $p=0,2227$) (figura 16).

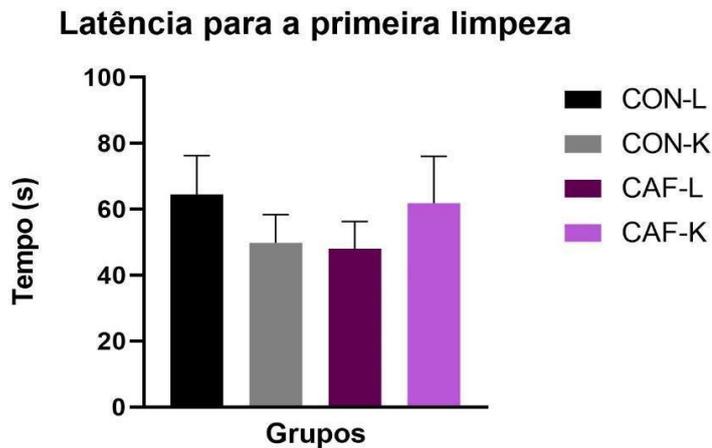


Figura 15 - Latência para a primeira limpeza. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 11) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

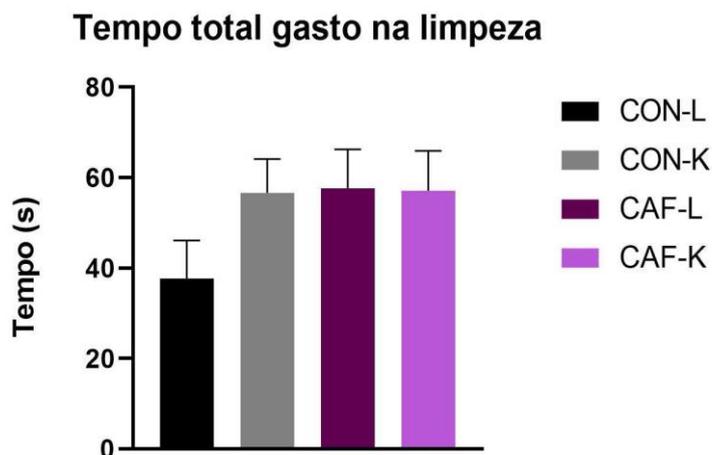


Figura 16 – Tempo total gasto na limpeza. Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L (n = 11), CAF-L (n = 11), CON-K (n = 11) e CAF-K (n = 12). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.

5.8.5 Nado Forçado

No teste de nado forçado foram avaliados o tempo de natação (figura 17 – a), imobilidade (figura 17 – b) e escalada (figura 17 – c). Para os tempos de natação e imobilidade foi realizado a ANOVA de uma via. O teste não apontou diferenças nos tempos de natação ($F(3,42) = 0,8467$, $p=0,4762$) e no tempo de imobilidade ($F(3,42) = 1,008$; $p=0,3986$) entre os grupos. Para o tempo de escalada foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, que também não mostrou diferenças entre os grupos ($p=0,3335$). Tanto a dieta como o kefir não foram capazes de promover comportamento tipo depressivo ou antidepressivo nos animais.

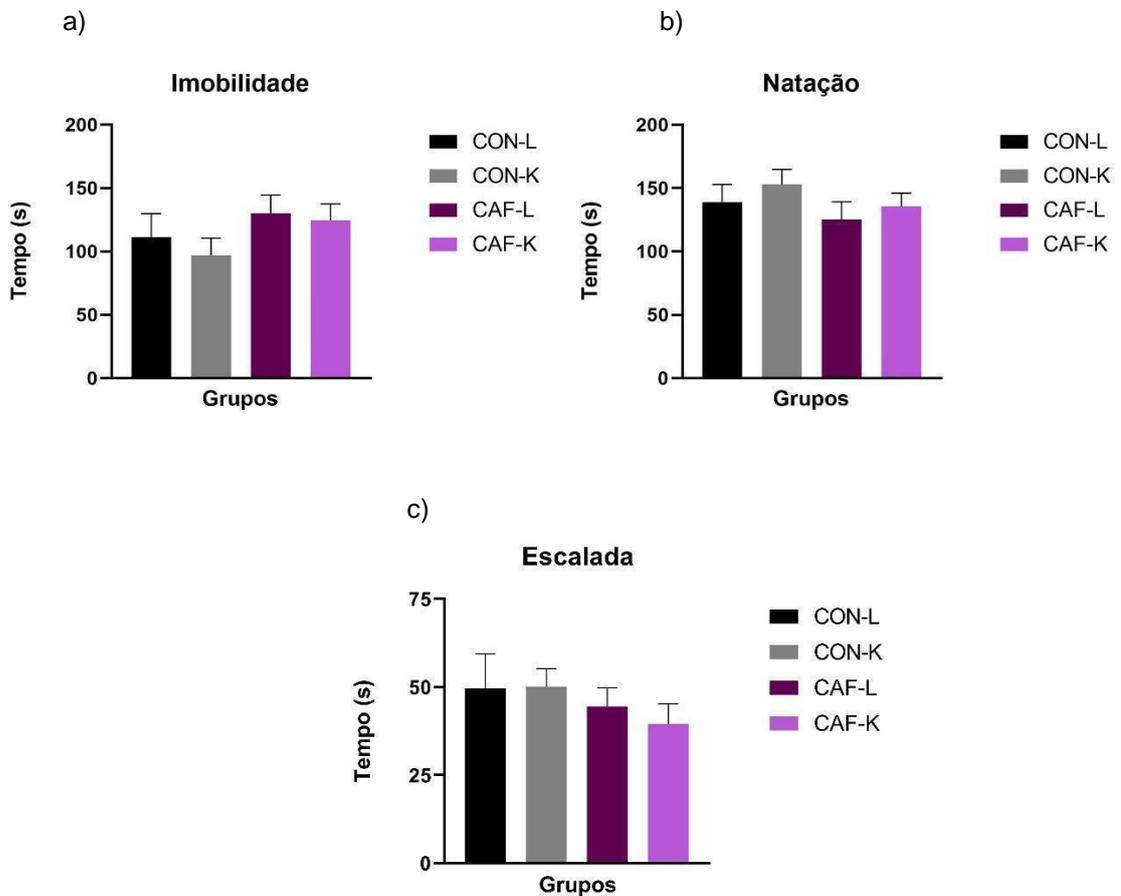


Figura 17 – Tempo de natação (a), imobilidade (b) e escalada (c). Os valores são apresentados como média \pm EPM em CON-L ($n = 11$), CAF-L ($n = 11$), CON-K ($n = 12$) e CAF-K ($n = 12$). Os dados de natação e imobilidade foram analisados pelo ANOVA de uma via. Os dados de escalada foram analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR

Os perfis genéticos gerados por BOX-PCR *fingerprinting* dos isolados indicaram a variabilidade genotípica entre as bactérias isoladas do kefir (figura 18). Considerando um corte de 70% de similaridade, doze grupos foram identificados.

As cepas KF05 e KF08 apresentaram perfil muito semelhante, assim como a KF02 e KF13. Já as cepas KF04, KF06, KF07, KF10, KF14, KF15, KF16, KF17, KF18 e KF19 apresentaram perfis genômicos BOX-PCR exclusivos. A partir da análise macroscópica, foram identificadas oito bacilos e quatro cocos.

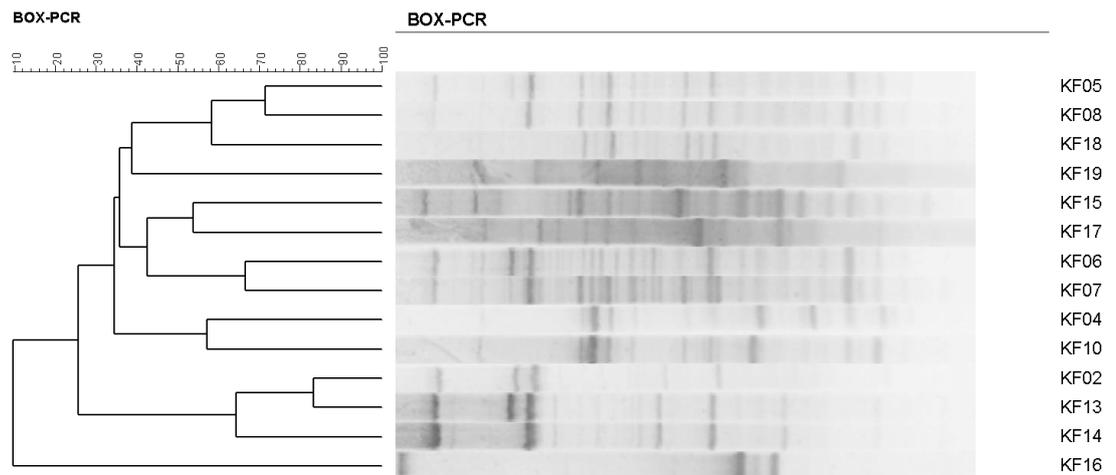


Figura 18. Dendrograma de similaridade baseado em perfis BOX-PCR de bactérias isoladas do kefir, realizado com o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6) usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard, com 3% de tolerância.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que uma dieta CAF hiperpalatável administrada desde os 30 dias de vida, durante dez semanas, a ratos machos aumentou o consumo alimentar, a ingestão calórica, e como consequência, houve maior ganho de peso ao longo das semanas e adiposidade corporal nesses grupos. Os depósitos de gordura dos grupos alimentados com CAF foram maiores em relação aos grupos controle e o índice de Lee, que visa avaliar o desenvolvimento da obesidade em animais, mostrou diferença somente entre o grupo CAF-L e CON-L. De modo geral, a suplementação com o probiótico kefir não foi suficiente para atenuar os parâmetros alterados pela obesidade.

Os animais não apresentaram comportamento tipo ansioso no LCE ou comportamento tipo depressivo no NF e *splash test*. No CA, o número de linhas cruzadas e de *rearing* em conjunto com o número de entradas nos braços fechados do LCE mostram que não houve alteração na ambulação dos animais.

O elevado consumo alimentar, assim como a ingestão calórica, um maior ganho de peso e adiposidade corporal foram verificados em outros estudos que utilizaram o modelo de dieta de cafeteria visando mimetizar distúrbios metabólicos humanos (LALANZA *et al.*, 2014; PINTO JÚNIOR; SERAPHIM, 2012; SAMPEY *et al.*, 2011; GIUDETTI *et al.*, 2020; HOSSAIN *et al.*, 2020). Sabe-se que o consumo de alimentos palatáveis que compõem a dieta CAF induz hiperfagia, levando ao consumo

excessivo de alimentos de alta densidade energética presentes na dieta (SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009). Isso foi visto no trabalho de Bonfim e colaboradores (2021), em que a dieta CAF induziu hiperfagia, que foi associada a palatabilidade da dieta, que pode promover prazer induzido pelos estímulos alimentares sensoriais, contribuindo para o aumento no consumo alimentar. A hiperfagia ocorre devido a ampla integração entre o sistema homeostático e o sistema hedônico, em que neurônios hipotalâmicos se projetam para o sistema dopaminérgico mesolímbico para modular a fome hedônica e a motivação para comer, onde conta com a participação de vários neuropeptídeos hipotalâmicos que podem atuar modulando o consumo alimentar, como NPY, orexina e AgRP (LEIGH; LEE; MORRIS, 2018). O aumento da ingestão alimentar pode também estar associado ao comprometimento da sinalização de leptina em populações neuronais de núcleos hipotalâmicos, visto que a resistência à leptina em indivíduos obesos reduz o controle da saciedade, favorecendo a hiperfagia (GENCHI *et al.*, 2021).

O cálculo do índice de Lee, que visa avaliar o desenvolvimento da obesidade em animais, mostrou diferença somente entre o grupo CAF-L e CON-L, embora os animais do grupo CAF-K também tenham apresentado um maior teor de gordura corporal do que os controles, bem como maior tamanho dos depósitos de tecido adiposo branco (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal). Stephens (1980) buscou verificar a correlação da obesidade com o índice de Lee, o seu experimento consistiu em comparar três grupos, um alimentado com dieta palatável, grupo controle e o terceiro que sofreu emagrecimento por desnutrição. No final, ainda que os grupos diferiram significativamente no percentual de gordura corporal, não houve diferenças significativas em seus índices de Lee. O mesmo aconteceu na pesquisa de Malafaia *et al.* (2013), onde avaliaram a massa corporal, o peso da gordura retroperitoneal e gonadal e o índice de Lee em ratos alimentados com dieta normal ou dieta suplementada com sacarose, no final eles verificaram que o grupo suplementado apresentou maior massa corporal, maior quantidade das duas gorduras, mas não houve diferença no índice de Lee. No entanto, há trabalhos que consideram o índice de Lee uma boa ferramenta para o estudo da obesidade (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019; MACÊDO *et al.*, 2021). Dessa forma, o índice de Lee se mostra um tanto controverso, e pareceu ser um preditor fraco para avaliar o desenvolvimento da obesidade nessa pesquisa.

O acúmulo de tecido adiposo observado se deve a composição da dieta fornecida. Rolland e colaboradores (2002) apontam o tipo e qualidade da gordura ingerida tem papel no controle do metabolismo energético, visto que dietas ricas em ácidos graxos saturados são mais obesogênicas, pois são usadas de forma ineficiente para a produção de energia e acabam sendo armazenadas com facilidade. A dieta CAF faz com que os animais sejam incapazes de utilizar a gordura no estado de repouso, produzindo uma quantidade exacerbada de tecido adiposo em relação aos grupos alimentados com a dieta padrão. O acúmulo de gordura, principalmente do tecido adiposo visceral, está associado ao desenvolvimento de processos patológicos, como o aumento da síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (RITCHIE; CONNELL, 2007).

O kefir utilizado nesta pesquisa não contribuiu para diminuir os estoques de gordura dos animais, mas estudos mostram que esse probiótico pode atenuar efeitos da obesidade. Na pesquisa de Tung e colaboradores (2018), foi avaliado o efeito do fornecimento diário de peptídeos de kefir durante 8 semanas em ratos obesos da linhagem Sprague Dawley, esses mostraram melhorar a obesidade por meio da inibição da lipogênese, modulação do dano oxidativo e estimulação da oxidação lipídica. Choi *et al.* (2017) apresentaram em sua pesquisa que o kefir utilizado diminuiu o peso corporal e o acúmulo de gordura epididimal de camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura. Ozsoy *et al.* (2021) investigaram se a administração diária de kefir nas quantidades de 10 mL/kg, 20 mL/kg e 30 mL/kg, através de gavagem, alterava parâmetros sanguíneos e modifica a composição da microbiota de ratos. Eles verificaram redução nos níveis de triglicerídeos nos grupos tratados com 20 mL/kg e 30 mL/kg e não houve diferenças significativas na concentração de colesterol entre os grupos, mas uma redução linear com o aumento da dose de kefir. Além disso, verificaram um aumento do número de bactérias benéficas e diminuição de bactérias nocivas, apontando efeitos positivos da ingestão de kefir nos animais. Dessa forma, é possível que a quantidade de 2 mL fornecida diariamente aos animais dessa pesquisa não foi suficiente para promover diferenças significativas nas análises realizadas.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, não houve diferença na concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol total. Na concentração plasmática de glicose, os animais CAF-L se mostraram hiperglicêmicos em relação

aos grupos CON-L e CON-K, corroborando com diferentes estudos mostraram que a dieta de cafeteria aumenta ou altera o metabolismo da glicose, e também, verificaram aumentos nos níveis plasmáticos de insulina (SAMPEY *et al.*, 2011; GOMEZ-SMITH *et al.*, 2016; LEWIS; SINGH; YOUSSEF, 2019), sendo a última análise não realizada nesse estudo. Outro trabalho encontrou resultados distintos, onde a homeostase da glicose foi mantida em todos os grupos do estudo, no entanto, foram encontrados níveis plasmáticos de leptina e colesterol elevados nos animais alimentados com dieta CAF quando comparado a animais que receberam uma dieta rica em gordura à base de manteiga ou o grupo controle (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019). A homeostase de lipídios e glicose são regulados pelo tecido adiposo, a desregulação desse tecido associado ao consumo exagerado de alimentos ricos em gorduras está relacionada a doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, resistência à insulina e doenças cardiovasculares (GUILHERME *et al.*, 2008). A ativação de vias bioquímicas inflamatórias gera prejuízos a sinalização intracelular de insulina, diminuindo a capacidade do músculo esquelético e outros tecidos de captar glicose para as células, promovendo um estado hiperglicêmico (FREITAS; CESCINI; RAMALLO, 2014), considerado uma fonte de estresse oxidativo na obesidade (VINCENT; TAYLOR, 2006).

O tempo da dieta se mostra um fator importante para gerar alterações metabólicas através da dieta CAF. Neste estudo, dez semanas foi o tempo suficiente para observar as alterações fenotípicas geradas pela obesidade, mas não para todas as alterações bioquímicas e comportamentais. No trabalho de Lewis, Singh e Youssef (2019), ratos Sprague Dawley foram alimentados durante 20 semanas com uma dieta de cafeteria, e foram observadas alterações fenotípicas relacionadas à obesidade, condição pré-diabética caracterizada por intolerância à glicose, níveis elevados de insulina, dislipidemia, aumento do colesterol LDL e menor concentração plasmática do colesterol HDL. Dessa forma, foi possível promover um modelo de síndrome metabólica a partir da dieta CAF.

Em relação ao comportamento tipo ansioso, o kefir e/ou a dieta não provocaram efeito ansiolítico nos animais, visto que não foram observados aumento no tempo de permanência no braço aberto do LCE em relação ao grupo controle. Lanza *et al.* (2014) forneceram uma dieta CAF por 8 semanas a ratos machos buscando avaliar o seu efeito sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais, por

meio do LCE verificaram que os animais do grupo CAF permaneceram mais tempo no braço aberto, mostrando um efeito ansiolítico da dieta, e no CA mostrou reduzir a atividade locomotora dos animais. Pini e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes, onde o grupo alimentado com dieta de cafeteria e o grupo alimentado com dieta hipercalórica apresentaram comportamentos indicativos de menor ansiedade no LCE. Guedine *et al.* (2020) alimentaram ratos filhotes machos com dieta CAF em períodos distintos, onde foram divididos em grupos controle (C), dieta CAF lactação (CL), dieta CAF pós-lactação (CP) e dieta CAF total (CT). Os animais CP e CT apresentaram maiores níveis de ansiedade em comparação com os outros grupos no LCE, mostrando que a dieta CAF também pode ser ansiogênica. Quanto ao kefir, o seu efeito na ansiedade, depressão e comprometimento cognitivo foi avaliado por Noori *et al.* (2014) em modelo animal submetido ao estresse devido ao uso de nicotina. O kefir utilizado foi fermentado tanto no leite de soja quanto no leite de vaca, e ambos os tipos de kefir foram capazes de reduzir o comportamento tipo ansioso, diminuir a gravidade da depressão e melhorar a função cognitiva durante o tratamento.

O teste de reconhecimento de objetos considera que um índice de reconhecimento acima de 0,5 indica que o animal explorou mais tempo o objeto novo em relação ao familiar, no entanto, não houve diferenças entre os grupos, mostrando não haver efeito da dieta ou do kefir na memória declarativa de curto prazo dos animais. Estudos apontam que probióticos, de modo geral, são benéficos para a memória (WANG *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; HO *et al.*, 2019; CANNAVALE *et al.*, 2023). Em uma investigação clínica não controlada com pacientes com doença de Alzheimer foi realizada a suplementação dietética com leite fermentado a partir do grão de kefir, com a realização de testes foi visto que a maioria teve melhora na memória, que está associada a diminuição absoluta/relativa em vários marcadores de citocinas de inflamação e marcadores de estresse oxidativo, mostrando que o kefir melhorou os déficits cognitivos (TON *et al.*, 2020). Em estudo com camundongos, van de Wouw (2020) também encontrou resultados positivos do kefir, onde esse modulou positivamente aspectos do eixo microbiota-intestino-cérebro e o comportamento do hospedeiro. A microbiota está intimamente relacionada a função cognitiva e ao processo inflamatório, sendo esse possivelmente responsável pelo comprometimento cognitivo, visto em que alterações na microbiota, um aumento da liberação de LPS

pode provocar ativação dos receptores do tipo Toll-Like (TLR) e desencadear o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (LIU *et al.*, 2022) e aumento na permeabilidade intestinal (KÖHLER; MCCORMICK; WALKER, 2003).

Em relação a dieta, é bem estabelecido na literatura que animais alimentados com dieta hiperlipídica tem propensão a apresentar prejuízos na memória dependente do hipocampo (CIFRE, PALOU, OLIVER, 2018; BONDAN *et al.*, 2019; AJAYI *et al.*, 2021; LEYH, 2021). Teixeira *et al.* (2020) verificaram através do teste de reconhecimento de objetos que animais alimentados com dieta CAF tiveram prejuízos na memória, esses apresentaram características de estresse oxidativo no hipocampo, o que pode ter comprometido a sua estrutura. Além disso, processos inflamatórios proveniente de uma dieta hiperlipídica alteram as funções do hipocampo, contribuindo para os prejuízos da memória (BOITARD *et al.*, 2014).

No CA, o número de linhas cruzadas, frequência de *rearing* e o número de entradas no LCE foram medidas utilizadas para avaliar a atividade locomotora dos animais, e mostraram que os animais não possuíam problemas na locomoção, e que essa não foi alterada pela dieta e/ou suplementação.

Para verificar sintomas depressivos foram realizados o teste de nado forçado e o *splash test*, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados em ambos os testes, não mostrando efeito da dieta e da suplementação com kefir. Sun *et al.* (2019) buscaram avaliar o efeito da bactéria *Lactobacillus kefiranofaciens* (ZW3) isolada de grãos de kefir tibetano na depressão usando um modelo de camundongo de estresse leve crônico imprevisível, através do teste de nado forçado verificaram que o tempo de imobilidade do grupo que sofreu o modelo de estresse foi maior do que o controle, após suplementação com a cepa bacteriana o tempo de imobilidade desses animais diminuiu significativamente, mostrando que um efeito antidepressivo. Chen *et al.* (2021) encontraram efeitos antidepressivos a partir da administração de peptídeos de kefir (PK) em camundongos, esses apresentaram uma redução no tempo de imobilidade no teste de nado forçado e no teste de suspensão pela cauda, indicando que o PK melhorou os comportamentos tipo depressivo. Em relação a dieta, Leffa *et al.* (2015) aponta em seu estudo que o consumo de alimentos palatáveis com grandes quantidades de açúcar e gordura induziu comportamento antidepressivo e ansiolítico nos animais, em

conjunto, foram observados aumento nos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e Fator de crescimento nervoso (NGF) no hipocampo de camundongos.

Os resultados do BOX-PCR *fingerprinting* mostraram que o kefir fornecido aos animais possuía bactérias de espécies diferentes. Essa variedade de espécies também foi encontrada no trabalho de Witthuhn, Schoeman e Britz (2004) e Marshall, Cole, Brooker, (1984), onde os lactobacilos estiveram presentes na maior parte dos grãos analisados, mostrando a importância desse grupo na produção de kefir.

O estudo dos microrganismos presentes no kefir e seus efeitos benéficos são proeminentes quando se estuda o probiótico multiespécies em comparação com uma única cepa isolada (SLATTERY; COTTER; O'TOOLE, 2019), no entanto, para ser considerado um probiótico, os microrganismos precisam ter algumas características, como resistência aos ácidos biliares e a acidez gástrica, adesão ao muco e/ou células epiteliais e linhas celulares, atividade antimicrobiana e outras (FIJAN, 2014). Cassanego e colaboradores (2018) realizaram a identificação de microrganismos presentes em seis amostras de kefir por PCR, onde conseguiram isolar amostras de levedura e realizaram teste para simular a passagem pelo ambiente gastrointestinal, onde foram desconsideradas como probióticos, visto que não foram eficientes na passagem pela digestão pancreática.

7 CONCLUSÃO

A dieta de cafeteria é um modelo eficaz para induzir obesidade nos animais, visto que aumentou o consumo alimentar, a ingestão calórica, o ganho de peso e os estoques de gordura dos animais. Assim como a dieta, a suplementação com kefir não promoveu mudanças comportamentais nos animais. Além disso, o kefir não foi capaz de atenuar os marcadores de obesidade alterados pela dieta de cafeteria.

REFERÊNCIAS

- AJAYI, A. M. *et al.* High-fat diet-induced memory impairment and anxiety-like behavior in rats attenuated by peel extract of *Ananas comosus* fruit via atheroprotective, antioxidant and anti-inflammatory actions. **Metabolism open**, v. 9, p. 100077, jan. 2021.
- ÁLVAREZ-SUÁREZ, P. *et al.* The effect of recording interval length on behavioral assessment using the forced swimming test. **Revista Iberoamericana de Psicología y Salud**, v. 6, n. 2, p. 90-95, jul. 2015.
- American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. Tradução de Maria Inês Corrêa Nascimento *et al.* 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, mai. 2012.
- APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **The American journal of managed care**, v. 22, supl. 7, p. s176-s185, jun. 2016.
- ARON-WISNEWSKY, J. *et al.* Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health-Pathophysiology and Therapeutic Strategies. **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, p. 573-599, jan. 2021.
- BERGMANN, R. S. de O. *et al.* Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 1022-1026, dez. 2010.
- BERK, M. *et al.* Lifestyle management of unipolar depression. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 127, n. 443, p. 38–54, abr. 2013.
- BERTHOUD, H. R.; MORRISON, C. D.; MÜNZBERG, H. The obesity epidemic in the face of homeostatic body weight regulation: What went wrong and how can it be fixed? **Physiology & Behavior**, v. 222, p. 112959, ago. 2020.
- BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234-256, jul. 2020.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306–1311, out. 2006.
- BOITARD, C. *et al.* Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 40, p. 9–17, ago. 2014.

BOLSONI-LOPES, A.; FURIERI, L. B.; ALONSO-VALE, M. I. C. Obesidade e a covid-19: uma reflexão sobre a relação entre as pandemias. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 42, n. spe, p. e20200216, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rngenf/a/4TLQWHNwc6vHmhpGMhx7WCR/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 21 jun. 2022.

BONDAN, E. F. *et al.* Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 77, n.s 9, p. 601-608, set. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/DV4mLzxTsyFWq7gybpR5s5n/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 27 nov. 2022.

BONFIM, T. *et al.* Potentially obesogenic diets alter metabolic and neurobehavioural parameters in Wistar rats: a comparison between two dietary models. **Journal of affective disorders**, v. 279, p. 451–461, jan. 2021.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295–303, set. 2015.

BOUTER, K. E. *et al.* Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1671–1678, mai. 2017.

BRUMPTON, B. *et al.* The associations of anxiety and depression symptoms with weight change and incident obesity: The HUNT Study. **International journal of obesity (2005)**, v. 37, n. 9, p. 1268-1274, set. 2013.

BUNN, C. *et al.* Obesity as a risk factor for the admission of COVID-19 patients into ICU: A systematic review and meta-analysis. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 8, n. OCE1, p. E.23, dez. 2022.

BUYUKDERE, Y.; GULEC, A.; AKYOL, A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. **PeerJ**, v. 7, p. e6656, abr. 2019.

CABRAL, A. *et al.* Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 8, p. 542–554, ago. 2014.

CAN, A. *et al.* The mouse forced swim test. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 59, p. e3638., jan. 2012.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, jul. 2007.

CANNAVALE, C. N. *et al.* Consumption of a fermented dairy beverage improves hippocampal-dependent relational memory in a randomized, controlled cross-over trial. **Nutritional neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 265-274, mar. 2023.

CARABOTTI, M. *et al.* The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals of gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 203–209, abr./jun. 2015.

CARASI, P. *et al.* Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of immunology research**, v. 2015, n. 2015, p. 361604, fev. 2015.

CARON, A. *et al.* Leptin and brain-adipose crosstalks. **Nature reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 153–165, fev. 2018.

CARTER, M.; SHIEH, J. Animal Behavior. In: CARTER, M.; SHIEH, J. **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. 2. ed. Elsevier Science Publishing Co, 2015, p. 39-71.

CASSANEGO, D. *et al.* Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 38, supl. 1, p. 59-65, dez. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/jCFpNdr7bGPxMRQqKCFNCWm/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 26 nov. 2022.

CHAKAROV, S.; BLÉRIOT, C.; GINHOUX, F. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. **The Journal of experimental medicine**, v. 219, n. 7, p. e20211948, jul. 2022.

CHEN, H. L. *et al.* Kefir peptides exhibit antidepressant-like activity in mice through the BDNF/TrkB pathway. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 6, p. 6415–6430, jun. 2021.

CHOI, J. W. *et al.* Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 81, n. 5, p. 958–965. mai. 2017.

CIFRE, M.; PALOU, A.; OLIVER, P. Cognitive impairment in metabolically-obese, normal-weight rats: identification of early biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. **Molecular Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p.14, mar. 2018.

CRYAN, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877-2013, out. 2019.

D'AUDIFFRET, A. C. *et al.* Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **Journal of Applied Physiology**, v. 108, p. 1041-1051, fev. 2010.

DELZENNE, N. M.; NEYRINCK, A. M.; CANI, P. D. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. **Microbial cell factories**, v. 10, supl. 1, s1-s10, ago. 2011.

DERTLİ, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151-157, nov. 2017.

DIETZE, S. *et al.* Food Deprivation, Body Weight Loss and Anxiety-Related Behavior in Rats. **Animals**, v. 6, n. 1, p. 4, jan. 2016.

DINAN T. G.; QUIGLEY E. M. Probiotics in the treatment of depression: science or science fiction? **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 45, n. 12, p. 1023-1025, dez. 2011.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, nov. 1988.

EVRENSEL, A.; TARHAN, K. N. Emerging role of Gut-microbiota-brain axis in depression and therapeutic implication. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 106, p. 110138, mar. 2021.

FARAG, M. A. *et al.* The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 1-23, jan. 2020.

FARHADIPOUR, M.; DEPOORTERE, I. The Function of Gastrointestinal Hormones in Obesity-Implications for the Regulation of Energy Intake. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1839, mai. 2021.

FERREIRA, A. P. S. *et al.* Increasing trends in obesity prevalence from 2013 to 2019 and associated factors in Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, supl. 2, p. e210009, dez. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/QVtDq9fGVsG7JjwDZrTcXFh/#>. Acesso em: 20 set. 2022.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 5, p. 4745–4767, mai. 2014.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. **Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p.139-147, set. 2014.

FULLER, R. Probiotics in Man and Animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULTON, S. *et al.* The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 18-35, jan. 2022.

GADDE, K. M. *et al.* Obesity: Pathophysiology and Management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 1, p. 69–84, jan. 2018.

GAO, J. *et al.* Tibet kefir milk decreases fat deposition by regulating the gut microbiota and gene expression of Lpl and Angptl4 in high fat diet-fed rats. **Food Research International**, v. 121, p. 278-287, jul. 2019.

GENCHI, V. A. *et al.* Impaired Leptin Signalling in Obesity: Is Leptin a New Thermolipokine? **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 12, p. 6445, jun. 2021.

GIUDETTI, A. M. *et al.* Brief daily access to cafeteria-style diet impairs hepatic metabolism even in the absence of excessive body weight gain in rats. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 7, p. 9358–9371, jul. 2020.

GOMEZ-SMITH, M. *et al.* A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiology & behavior**, v. 167, p. 382–391, dez. 2016.

GRUZDEVA, O. *et al.* Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 12, p. 191–198, jan. 2019.

GUEDINE, C. R. de C. *et al.* Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat Offspring. **Nutritional neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 526-536, jul. 2020.

GUILHERME, A. *et al.* Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, mai. 2008.

HAJJAR, A. M. *et al.* Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. **Nature immunology**, v. 3, n. 4, p. 354-359, abr. 2002.

HALL, K. D.; HAMMOND, R. A.; RAHMANDAD, H. Dynamic interplay among homeostatic, hedonic, and cognitive feedback circuits regulating body weight. **American Journal of Public Health**, v. 104, n. 7, p.1169-1175, jul. 2014.

HO, S. T. *et al.* Improving effect of a probiotic mixture on memory and learning abilities in d-galactose-treated aging mice. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 3, p. 1901–1909, mar. 2019.

HOSSAIN, M. J. *et al.* Evidence of Altered Peripheral Nerve Function in a Rodent Model of Diet-Induced Prediabetes. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, p. 313, ago. 2020.

IRIGOYEN, A. *et al.* Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 613-620, mai. 2005.

ISINGRINI, E. *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10404, abr. 2010.

IZQUIERDO, A. G. *et al.* Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2704, nov. 2019.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, v. 13, n. 3, p. 151-158, ago. 2004.

KELLY, J. R. *et al.* Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of psychiatric research**, v. 82, p. 109-118, nov. 2016.

KÖHLER, H.; MCCORMICK, B. A.; WALKER, W. A. Bacterial-enterocyte crosstalk: cellular mechanisms in health and disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 36, n. 2, p. 175-185, fev. 2003.

KOLAKOWSKI, P.; OZIMKIEWICZ, M. Restoration of kefir grains subjected to different treatments. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 140–145, nov. 2012.

KRAEUTER, A.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: GUEST, P. C. **Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols**. Primeira edição. Humana New York, NY, 2019, p. 99-103.

LALANZA, J. F. *et al.* Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85049, jan. 2014.

LALANZA, J. F.; SNOEREN, E. M. S. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 122, p. 92-119, mar. 2021.

LASSELIN, J.; CAPURON, L. Chronic Low-Grade Inflammation in Metabolic Disorders: Relevance for Behavioral Symptoms. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 2-3, p. 95-101, fev. 2014.

LEFFA, D. D. *et al.* Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 4, p. 1073–1082, ago. 2015.

LEFTER, R. *et al.* A new biological approach in generating an irritable bowel syndrome rat model – focusing on depression in sucrose splash test and body weight change. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 25, n. 3, p. 1554-1562, jun. 2020.

LEIGH, S. J.; LEE, F.; MORRIS, M. J. Hyperpalatability and the Generation of Obesity: Roles of Environment, Stress Exposure and Individual Difference. **Current Obesity Reports**, v. 7, n.1 p. 6-18, mar. 2018.

LENTOOR, A. G. Obesity and Neurocognitive Performance of Memory, Attention, and Executive Function. **NeuroSci**, v. 3, n. 3, p. 376-386, jun. 2022.

LEWIS, A. R.; SINGH, S.; YOUSSEF, F. F. Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. **Heliyon**, v. 5, n. 3, p. e01412, mar. 2019.

LEYH, J. *et al.* Long-term diet-induced obesity does not lead to learning and memory impairment in adult mice. **PloS one**, v. 16, n. 9, p. e0257921, set. 2021.

LIU, P. *et al.* Gut Microbiome Composition Linked to Inflammatory Factors and Cognitive Functions in First-Episode, Drug-Naive Major Depressive Disorder Patients. **Frontiers in neuroscience**, v. 15, p.1-12, jan. 2022.

LOMBROSO, P. Aprendizado e memória. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 207-210, set. 2004.

LORENZO A. de *et al.* Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease. **Nutrition**, v. 71, p. 110615, mar. 2020.

MACÊDO, A. P. A *et al.* Murinometric measurements and retroperitoneal adipose tissue in young rats exposed to the high-fat diet: Is there correlation? **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 246-250, nov. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/5VyrSRckDz44nhvjJRprF9m/?format=pdf&lang=e>. Acesso em: 25 nov. 2022.

MALAFAIA, A. B. *et al.* Obesity induction with high fat sucrose in rats. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery**, v. 26, supl 1, p. 17–21, jan. 2013.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 57, n. 3, p. 491-497, dez. 1984.

MELDRUM, D. R.; MORRIS, M. A.; GAMBONE, J. C. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 4, p. 833-839, abr. 2017.

MICHOPOULOS, V. *et al.* Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 254–270, jan. 2017.

MIKAIL, H. G. *et al.* Sertraline behavioral response associates closer and dose-dependently with cortical rather than hippocampal serotonergic activity in the rat forced swim stress, **Physiology & Behavior**, v. 107, n. 2, p. 201-206, set. 2012.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, B. M. de; FROTA, C. C. **Visualização bacteriana e colorações**. 1. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. **Current protocols in microbiology**, ap. 3, nov. 2009.

MYLES, I. A. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 61, jun. 2014.

NERY, C. S. *et al.* Medidas Murinométricas e Eficiência Alimentar em Ratos Provenientes de Ninhadas Reduzidas na Lactação e Submetidos ou Não ao Exercício de Natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, fev. 2011.

NIELSEN, B.; GÜRAKAN, G. C.; ÜNLÜ, G. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 123–135, dez. 2014.

NOORI, N. *et al.* Kefir protective effects against nicotine cessation-induced anxiety and cognition impairments in rats. **Advanced biomedical research**, v. 3, n. 251, dez. 2014.

NOURI, A. *et al.* Progesterone exerts antidepressant-like effect in a mouse model of maternal separation stress through mitigation of neuroinflammatory response and oxidative stress. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 64-71, jan. 2020.

OBERNIER, J. A.; BALDWIN, R. L. Establishing an Appropriate Period of Acclimatization Following Transportation of Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 47, n. 4, p. 364–369, out. 2006.

OBRADOVIC, M. *et al.* Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 585887, mai. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS (2017). **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 26 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS (2019). **World Health Statistics 2019: monitoring health for the SDGs**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565707>. Acesso em: 27 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS (2021). **Obesity and overweight**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em 26 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS (2022). **World Health Statistics 2022: monitoring health for the SDGs**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>. Acesso em: 27 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. (2010). **A healthy lifestyle - WHO recommendations**. Disponível em: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>. Acesso em: 29 set. 2022.

OUCHI, N. *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, jan. 2011.

OZSOY, B. *et al.* Effects of Kefir on Blood Parameters and Intestinal Microflora in Rats: An Experimental Study. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 27, n.1, p.111-115, dez. 2021.

PAN, W. W.; MYERS JR., M. G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nature reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 95–105, fev. 2018.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition & Health**, v. 29, p. 4-8., 1974.

PAULITSCH, F. **Análise polifásica de estirpes brasileiras de beta-rizóbios do gênero paraburkholderia**. 2021. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

PETRY, N. M. *et al.* Overweight and obesity are associated with psychiatric disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Psychosomatic medicine**, v. 70, n. 3, p. 288–297, abr. 2008.

PINI, R. T. B. *et al.* Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. **Nutritional neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 396-408, set. 2017.

PINTO JÚNIOR, D. A. C.; SERAPHIM, P. M. Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 313-319, jun. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/spn9TLTbdVSmJpKHJ8wWzPq/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 19 nov. 2022.

POPKIN, B. M. *et al.* Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 11, e13128, nov. 2020.

PRADO W. L. do *et al.* Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 15, n. 5, p. 378-383, out. 2009 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922009000600012>. Acesso em: 10 nov. 2022.

PRADOS-BO, A. *et al.* Online information in Spanish on probiotics, yoghurt, kefir, kombucha, fibre and prebiotics: an analysis of the quality of information and the certainty of the evidence supporting health claims. **BMJ Open**, v. 3, n. 12, p. e063316, ago. 2022.

PREISS, K.; BRENNAN, L.; CLARKE, D. A systematic review of variables associated with the relationship between obesity and depression. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 14, n. 11, p. 906–918, nov. 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3-33, fev. 2003.

QUEIROZ, J. C. F. de *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582-594, jul. 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000500011>. Acesso em: nov. 2022.

RAISON, C. L. *et al.* Randomized Controlled Trial of the Tumor Necrosis Factor Antagonist Infliximab for Treatment-Resistant Depression: The Role of Baseline Inflammatory Biomarkers. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 31-41, ago. 2013.

RITCHIE, S. A.; CONNELL, J. M. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 17, n. 4, p. 319–326, mai. 2007.

ROBERTO, C. A. *et al.* Patchy progress on obesity prevention: emerging examples, entrenched barriers, and new thinking. **The Lancet**, v. 385, n. 9985, p. 2400-2409, jun. 2015.

ROCHA-GOMES, A. *et al.* High-fat diets are detrimental of the lipid profile, glucose metabolism and body composition of Wistar rats: the role of fatty acid type and consumption duration, **Nutrition & Food Science**, v. 51, n. 5, p. 781-791, set. 2020.

ROLLAND, V. *et al.* Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter. **The American journal of clinical nutrition**, v. 75, n. 1, p. 21-30, jan. 2002.

ROSA, M. L. G. *et al.* O papel do tecido adiposo na obesidade e na insuficiência cardíaca. **Insuficiência cardíaca**, v. 14, n. 2, p. 46-54, jun. 2019.

ROVIDA, A. F. da S. *et al.* Herbicides Tolerance in a Pseudomonas Strain Is Associated With Metabolic Plasticity of Antioxidative Enzymes Regardless of Selection. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, p. 673211, jun. 2021.

SAELY, C. H.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. **Gerontology**, v. 58, n. 1, p. 15–23, dez. 2012.

SAMPEY, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, jun. 2011.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 3, p. 461-471, set. 1976.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 96, p. e52434, fev. 2015.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 34-38, fev. 2009.

SHALEV, D.; ARBUCKLE, M. R. Metabolism and Memory: Obesity, Diabetes, and Dementia. **Biological psychiatry**, v. 82, n. 11, p. e81–e83, dez. 2017.

SIMOVA, E. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 1-6, jan. 2002.

SIMPSON, C. A. *et al.* The gut microbiota in anxiety and depression - A systematic review. **Clinical psychology review**, v. 83, p. 101943, fev. 2021.

SLATTERY, C.; COTTER, P. D.; O'TOOLE, P. W. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1252, jun. 2019.

SOUSA, A. B. de; SALGADO, T. D. M. Memória, aprendizagem, emoções e inteligência. **Revista Liberato**, v. 16, n. 26, p. 141–152, dez. 2015. Disponível em: <https://revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/363>. Acesso em: 23 nov. 2022.

STEPHENS D. N. Does the Lee obesity index measure general obesity? **Physiology & behavior**, v. 25, n. 2, p. 313–315, ago. 1980.

SUN, Y. *et al.* Supplementation with *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. **Food & Function**, v. 10, n. 2, p. 925-937, fev. 2019.

TAN, K. X.; CHAMUNDESWARI, V. N.; LOO, S. C. J. Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. **RSC advances**, v. 10, n. 42, p. 25339–25351, jun. 2020.

TEIXEIRA, A. E. *et al.* Cafeteria diet administered from lactation to adulthood promotes a change in risperidone sensitivity on anxiety, locomotion, memory, and social interaction of Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 220, p. 112874, jun. 2020.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, out. 2006.

TON, A. M. M. *et al.* Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 2638703, 2020.

TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11, p. 887-894, nov./dez. 2007.

TUNG, Y. T. *et al.* Kefir Peptides Prevent Hyperlipidemia and Obesity in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats via Lipid Metabolism Modulation. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 3, fev. 2018.

VAN de WOUW, M. *et al.* Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 67, mai. 2020.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity (2005)**, v. 30, n. 3, p. 400–418, mar. 2006.

VOSS, J. L.; PALLER, K. A. Brain substrates of implicit and explicit memory: the importance of concurrently acquired neural signals of both memory types. **Neuropsychologia**, v. 46, n. 13, p. 3021–3029, nov. 2008.

WALF, A. A.; CHERYL, A. F. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322-328, mar. 2007.

WANG, F. *et al.* Long-term combined administration of Bifidobacterium bifidum TMC3115 and Lactobacillus plantarum 45 alleviates spatial memory impairment and gut dysbiosis in APP/PS1 mice. **FEMS microbiology letters**, v. 367, n. 7, p. fnaa048, abr. 2020.

WASIM, M., *et al.* Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. **Biochemical genetics**, v. 54, n. 5, p. 565–572, jun. 2016.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, dez. 2013.

WENSVEEN, F. M. *et al.* The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **European journal of immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446–2456, set. 2015.

WITTHUHN, C.; SCHOEMAN; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 33-37, fev., 2004.

WRIGHT, S. M.; ARONNE, L. J. Causes of obesity. **Abdominal Radiology**, v. 37, n. 5, p. 730-732, out. 2012.

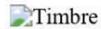
YANG, X. *et al.* Probiotics modulate the microbiota-gut-brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 10, n. 3, p. 475–487, mar. 2020.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 97, p. 52587, mar. 2015.

ZANINI, P. *et al.* Diet-induced obesity alters memory consolidation in female rats. **Physiology & behavior**, v. 180, p. 91–97, out. 2017.

ZHENG, P. *et al.* Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 6, p. 786-796, jun. 2016.

18/08/2021 <https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=52897e473d&attid=0.2&permmsgid=msg-f:17084420543...>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

Carta

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA: 0575718/2021

Protocolo UEPG: 21.000026792-9

Título: Efeito da suplementação com kefir nas alterações comportamentais e de microbiota intestinal provocadas pela obesidade

Interessado: Marcelo Machado Ferro

e-mail: mferro@uepg.br

Data de Entrada: 14/07/2021

Resultado: Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 48 animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem/raça: Wistar, sexo: machos, idade: 21 dias e peso aproximado de 30 g, no início do experimento, para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 07 de agosto de 2021

Profª. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

<https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=52897e473d&attid=0.2&permmsgid=msg-f:1708442054320108697&th=...> 1/2

18/08/2021 <https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=52897e473d&attid=0.2&permmsgid=msg-f:17084420543...>



Documento assinado eletronicamente por **Luciana da Silva Leal Karolewski, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP**, em 07/08/2021, às 08:05, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0575718** e o código CRC **7EAF4669**.

21.000026792-9

0575718v2