UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RODRIGO SOARES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS) SOBRE A DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO-ALCOÓLICO (NAFLD) EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA

Recife
2023

RODRIGO SOARES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS) SOBRE A DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO-ALCOÓLICO (NAFLD) EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientadora: Drª. Christina Alves Peixoto

Recife

2023

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Rodrigo Soares da.
Avaliação dos prebióticos (fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos) sobre a doença do fígado gorduroso não-alcoólico (NAFLD) em modelo animal de obesidade induzida por dieta. / Rodrigo Soares da Silva. – 2023.

76 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Christina Alves Peixoto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, 2023.
Inclui referências.

1. Obesidade. 2. NAFLD. 3. Disbiose. 4. Prebióticos. I. Peixoto, Christina Alves. (orient.). II.Título.

587 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2023-080

RODRIGO SOARES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS) SOBRE A DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO-ALCOÓLICO (NAFLD) EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 03/ 03/ 2023

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Christina Alves Peixoto (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Drª Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Drª. Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha (Examinadora Externa)

Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, gostaria de prestar meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a sua concretização.

A Deus pela dom da vida e pela conquista de mais essa etapa;

À minha mãe Maria Bernadete Soares e ao meu pai Severino Soares *(in memoriam)* por toda dedicação, incentivo, apoio e amor.

À minha noiva, Ana Patrícia, pelo companheirismo, amor, incentivo, atenção, ombro amigo nos momentos difíceis e principalmente paciência.

A todos os meus familiares, por toda a amizade e apoio.

À minha orientadora Profª Drª Christina Peixoto, pela confiança, atenção e orientação no meu trabalho durante esses anos.

As Professoras, Drª Fabiana Gomes, MSc Amanda Costa, Drª Edlene Lima, Drª Amanda Soares e Drª Mariana Donato, pelo apoio, conselhos inestimáveis, pela assessoria nos protocolos experimentais, amizade e carinho, pessoas que fizeram a diferença na minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de laboratório: Ingrid Prata, Igor Paiva, Diana Gomes, Clara Calábria e Neila Caroline pela imensa e valiosa ajuda durante e depois do desenvolvimento da minha dissertação.

Aos meus amigos, por apoio, incentivo e motivação

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida para realização deste trabalho.

Ao Instituo Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ pela viabilização e execução da parte experimental deste projeto.

Aos Coordenadores e funcionários da Pós-Graduação pelos esclarecimentos e ajuda.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos os amigos que fiz durante esta caminhada.

RESUMO

A obesidade e outros distúrbios metabólicos são fatores de risco para a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), que por sua vez, pode levar à cirrose e ao carcinoma hepatocelular e atualmente é reconhecida como a hepatopatia mais comum em todo o mundo, acometendo em torno de 30,05% da população. A fisiopatologia da NAFLD está amplamente relacionada aos distúrbios lipídicos e inflamatório. Evidências crescentes sugerem que o eixo intestino-microbiota-fígado desempenha um papel central nas doenças metabólicas, e a disbiose intestinal tem sido associada à NAFLD e sua gravidade. No presente estudo, foi avaliado os efeitos de dois prebióticos disponíveis comercialmente (frutooligossacarídeos [FOS] e galactooligossacarídeos [GOS]) na inflamação hepática, sobre a via metabólica de lipídios e na microbiota intestinal em modelo de NAFLD induzida por dieta rica em gordura. Utilizamos 45 camundongos C57BL6 wild-type que foram distribuídos nos seguintes grupos: (A) dieta padrão controle (n=15) e (B) HFD por 18 semanas (n=30). Na 13ª semana, os camundongos foram posteriormente divididos nos seguintes grupos experimentais: (A) Controle (n=15); (B) HFD (n=14); e (C) HFD+Prebióticos (n=14). O grupo HFD+Prebióticos recebeu uma dieta rica em gordura e uma combinação de FOS e GOS (0,3g e 0,4g/camundongo/dia de FOS e GOS, respectivamente). Os resultados indicaram que FOS e GOS efetivamente reduziram a resistência à insulina, hiperglicemia, trigliceridemia e colesterolemia. Além disso, FOS e GOS melhoraram a arquitetura hepática e o acúmulo de gordura hepática modulando as vias lipogênica (SREBP-1c, ACC e FAS) e lipolítica (ATGL). O tratamento com FOS e GOS também reduziu marcadores inflamatórios como p-NFκB-65, IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α e IL-1β. Além disso, FOS e GOS atenuaram o NAFLD modulando a composição da microbiota intestinal e fortalecendo a integridade da barreira intestinal, melhorando assim a via intestino-fígado e o metabolismo lipídico hepático. Sendo assim, nossos dados demonstram que FOS e GOS apresentam propriedades anti-inflamatórias e hipolipemiante, e indicam o potencial terapêutico desta fibras no tratamento da NAFLD.

Palavras-chave: Obesidade; NAFLD; Disbiose; Prebióticos.

ABSTRACT

Obesity and other metabolic disorders are risk factors for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which in turn can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma and is currently recognized as the most common liver disease worldwide, affecting in around 30.05% of the population. The pathophysiology of NAFLD is largely related to lipid and inflammatory disorders. Growing evidence suggests that the gut-microbiota-liver axis plays a central role in metabolic diseases, and gut dysbiosis has been linked to NAFLD and its severity. In the present study, we evaluated the effects of two commercially available prebiotics (fructooligosaccharides [FOS] and galactooligosaccharides [GOS]) on hepatic inflammation, on the lipid metabolic pathway and on the intestinal microbiota in a high-fat diet-induced NAFLD model. We used 45 wild-type C57BL6 mice that were distributed into the following groups: (A) standard control diet (n=15) and (B) HFD for 18 weeks (n=30). At the 13th week, the mice were further divided into the following experimental groups: (A) Control (n=15); (B) HFD (n=14); and (C) HFD+Prebiotics (n=14). The HFD+Prebiotics group received a high-fat diet and a combination of FOS and GOS (0.3g and 0.4g/mouse/day of FOS and GOS, respectively). The results indicated that FOS and GOS effectively reduced insulin resistance, hyperglycemia, triglyceridemia and cholesterolemia. Furthermore, FOS and GOS improved liver architecture and hepatic fat accumulation by modulating lipogenic (SREBP-1c, ACC and FAS) and lipolytic (ATGL) pathways. Treatment with FOS and GOS also included inflammatory markers such as p-NFκB-65, IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α and IL-1β. Furthermore, FOS and GOS attenuated NAFLD by modulating the composition of the intestinal microbiota and strengthening the integrity of the intestinal barrier, thus improving the intestine-liver pathway and hepatic lipid metabolism. Thus, our data demonstrate that FOS and GOS have anti-inflammatory and lipid-lowering properties, and show the therapeutic potential of these fibers in the treatment of NAFLD.

Keywords: Obesity; NAFLD; Dysbiosis; Prebiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Prevalência da NAFLD nas regiões do mundo - 1990 a 2019	15
Figura 2 –	Desenho esquemático do fígado	16
Figura 3 –	O desenvolvimento da NAFLD	18
Figura 4 –	Patogênese da NAFLD	19
Figura 5 –	Permeabilidade intestinal no desenvolvimento e progressão da NAFLD	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
FAS	Sintase de ácido graxo
FFAs	Ácidos graxos livres
FMT	Transplante de microbiota fecal
FOS	Frutooligossacáridos
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GOS	Galactooligossacáridos
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HSCs	Células estreladas hepáticas
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IRS	Receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal cinase
LPS	Lipopolissacarídeo
LXRα	Receptor X do fígado
NAFLD	Doença do fígado gorduroso não alcoólico
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NFkB	Nuclear factor kappa B
NK	Células natural killer
NKT	Natural Killer derivadas de células T
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCFAs	Ácidos graxos de cadeia curta
SM	Síndrome Metabólica
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
TA	Tecido adiposo
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TGs	Triglicerídeos
TJ	Tight junction
TLR-4	Receptores Toll Like - 4
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
α -GOS	Alfa - Galactooligossacáridos
β - GOS	Beta - Galactooligossacáridos

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	11
2	**OBJETIVOS**	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.1.1	**Objetivos Específicos**	13
3	**REFERENCIAL TEÓRICO**	14
3.1	DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)	14
3.1.1	**Fisiopatologia da NAFLD**	15
3.1.1.1	Metabolismo lipídico e NAFLD	20
3.1.1.1.1	*A inflamação e a NAFLD*	21
3.2	EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-FÍGADO	23
3.2.1	**Microbiota e NAFLD**	23
3.3	PREBIÓTICOS	27
3.3.1	**Frutooligossacarídeos**	29
3.3.1.1	Galactooligossacarídeos	30
3.3.1.1.1	*Prebióticos e NAFLD*	31
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	33
5	**CONCLUSÃO**	63
6	**SÚMULA CURRICULAR**	64
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada quando o volume de gordura acumulado no citoplasma dos hepatócitos quando supera 5% do peso hepático total e pode ser diagnosticado por um exame de imagem ou histológico (Younossi, et al., 2016; POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019). A NAFLD pode progredir para cirrose e é fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. A fisiopatologia da esteatose hepática é caracterizado pela teoria “two hits”. No primeiro “hit” temos um desequilíbrio no metabolismo lipídico como uma consequência da resistência à insulina, e da lipogênese *de novo* a partir de outras fontes de nutrientes (AHMED, 2015). O segundo “hit” envolve a peroxidação lipídica, a disfunção mitocondrial, e produção de mediadores inflamatórios levando a danos celulares nos tecidos hepático e adiposo, o que contribui para progressão da lesão hepática (WEISS; RAU; GEIER, 2014).

Estudos recentes demonstraram que o eixo microbiota-intestino-fígado desempenha um papel critico no início e na progressão das doenças hepáticas crônicas (BRANDT et al., 2017; ZHANG et al., 2018). A microbiota intestinal quando em equilíbrio, desempenha um papel importante na regulação metabólica da glicose e dos lipídios e apresenta efeitos anti-inflamatórios. Entretanto, a microbiota intestinal alterada (disbiose) está associada à NAFLD e à sua gravidade (Fan e Pedersen, 2021; Song e Zhang, 2022). A disbiose leva à endotoxemia e inflamação da parede intestinal, bem como à ativação de células de Kupffer e de células estreladas hepáticas através da ativação dos receptores Toll-like (TLRs). O fígado e o intestino têm uma relação funcional e anatômica íntima, uma vez que o fígado recebe aproximadamente 70% de suprimento sanguíneo do intestino através da circulação portal (COMPARE et al., 2012).

Modelos experimentais ou estudos clínicos mostram que a NAFLD está associada à uma alteração da microbiota e ao aumento da permeabilidade intestinal (BRUN et al., 2007; MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2016; SHANAB et al., 2011). Por sua vez, a permeabilidade intestinal leva à uma endotoxemia por translocação de LPS que podem ativar o TLR4. CANI e cols mostraram que a administração de LPS em camundongos simulou os efeitos de uma dieta gordurosa por endotoxemia metabólica, induzindo inflamação e ganho de peso corporal, resistência à insulina e

desenvolvimento de NAFLD (CANI et al., 2007). Interessantemente, os ácidos graxos saturados presentes nos alimentos, podem ativar o TLR4, devido à semelhança estrutural com o LPS, o que contribui para a lesão hepática (HUANG et al., 2012).

Assim, devido a correlação positiva entre a disbiose intestinal e a alteração do metabolismo hepático de carboidratos e lipídios, bem como ativação da inflamação (KOLODZIEJCZYK et al., 2019), pesquisas científicas tentam propor intervenções terapêuticas para NAFLD por meio da modulação da microbiota intestinal, através da suplementação de probióticos, prebióticos e simbióticos e transplante de microbiota fecal (FMT) (CHEN; VITETTA, 2020).

Os prebióticos são definidos como substâncias que induzem alterações na composição da microbiota gastrointestinal conferindo efeitos benéficos (ROBERFROID et al., 2010). Nesse contexto, prebióticos podem promover efeitos positivos na prevenção e/ou tratamento da NAFLD. Frutooligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) são fibras solúveis usadas como prebióticos que são tradicionalmente associadas com a estimulação da proliferação de bactérias benéficas como as *bífidobactérias* e *lactobacilos*, entre outros. A fermentação é o principal mecanismo de ação pelo qual os prebióticos são usados por bactérias no cólon (POKUSAEVA; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2011). A fermentação aumenta a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) (BINDELS et al., 2012; ROBERFROID et al., 2010), que são rapidamente absorvidos pelas células epiteliais do intestino e ativam diretamente os receptores acoplados a proteína G (ANG; DING, 2016; KOH et al., 2016; LU et al., 2016).

Portanto, a modulação da microbiota intestinal tem sido ativamente estudada como um fator-chave na fisiopatologia da NAFLD. Desta forma, o presente projeto tem por objetivo avaliar os efeitos de dois prebióticos comercialmente disponíveis (frutooligossacarídeos [FOS] e galactooligossacarídeos [GOS]) sobre as vias de sinalização do metabolismo hepático e inflamação no desenvolvimento da NAFLD em modelo experimental de obesidade induzido por dieta.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar os efeitos dos prebióticos (frutooligossacarídeos [FOS] e galactooligossacarídeos [GOS]) no desenvolvimento da doença do fígado gorduroso não-alcoólico (NAFLD) em modelo experimental de obesidade induzido por dieta.

2.1.1 ESPECÍFICOS

Avaliar a ação dos prebióticos sobre:

- Os parâmetros bioquímicas (Colesterol total; Triglicerídeos; LDL-c; HDL-c; Glicose e Insulina).
- Nas modificações histopatológicas no fígado;
- No estresse oxidativo através da expressão de iNOS e Nitrotirosina;
- Na expressão dos marcadores inflamatórios (pNFkB, IL-1β, IL-6,TNF-α e COX-2) e metabolismo lipídico (SRBP1, ACC, FAS e ATGL) envolvidos na patogênese da NAFLD;
- Na integridade intestinal na expressão da proteína ocludina;
- Na composição da microbiota.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

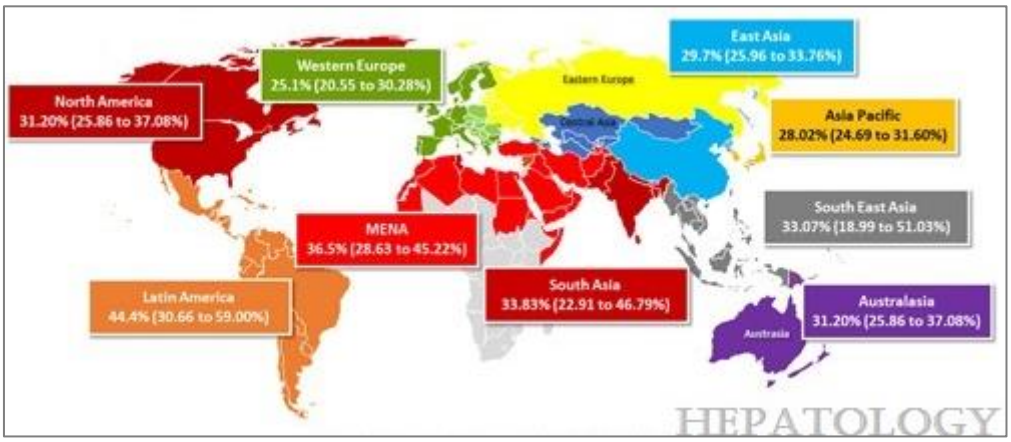
3.1 DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

A doença do fígado gorduroso não alcoólica (do inglês Nonalcoholic Fatty Liver Disease – NAFLD) é considerada a manifestação hepática com importante relação com a obesidade e a Síndrome Metabólica (SM). É definida, pelo acúmulo de lipídios no fígado supera 5% do peso hepático total e pela falta de causas secundárias, como uso de álcool de forma abusiva, hepatites virais ou mesmo distúrbios hereditários(BYRNE; TARGHER, 2015). A maioria dos pacientes com NAFLD são assintomáticos, e o diagnóstico inicial é realizado análises bioquímicas para enzimas hepáticas e por métodos de imagem como a ultrassonografia, entretanto a biopsia hepática é considerada padrão ouro(NALBANTOGLU; BRUNT, 2014).

Estudos epidemiológicos consideram a NAFLD a hepatopatia mais comum no mundo e relatam que a sua prevalência tem crescido nos últimos anos. Este rápido aumento, está associado à prevalência da síndrome metabólica e suas condições associadas (obesidade e diabetes mellitus tipo 2 - T2DM). No Brasil, estudos relatam a prevalência em 35,2%(KARNIKOWSKI et al., 2007) , entretanto esse dado foi realizado há mais de uma década, e possivelmente encontra-se defasado, pois recentemente uma metanálise com de mais de 9 milhões de indivíduos, demonstrou uma prevalência global da NAFLD em 30.05% e na América Latina em 44,37% (Figura 03)(YOUNOSSI et al., 2023).

Diante disso, é importante salientar que a gravidade do acometimento hepático, levando-se em consideração a prevalência e as consequências do acúmulo lipídico, o gerenciamento das doenças hepáticas deve ser prioridade em qualquer conduta médica, tendo em vista o propósito em impedir a progressão da lesão para cirrose e/ou hepatocarcinoma(PARENTE, 2020). Assim sendo, estudos devem ser conduzidos para o entendimento de sua fisiopatologia e tratamento.

Figura 1: Prevalência da NAFLD nas regiões do mundo - 1990 a 2019



Fonte: Younossi, et al. (2023)

Nota: Durante o ano de pesquisa de 1990 a 2019, o agrupamento meta-analítico das estimativas de prevalência da NAFLD resultou em uma prevalência global geral de 30,05%. North America = América do Norte; Latin America = América Latina; South Asia = Sul da Ásia; East Asia = Ásia leste; Asia Pacific = Ásia – Pacifico; South East Asia = Sudeste da Ásia; Australasia = Austrália; Western Europe = Europa ocidental; MENA = agrupamento dos países situados no Oriente Médio e Norte da África.

3.1.1 Fisiopatologia da NAFLD

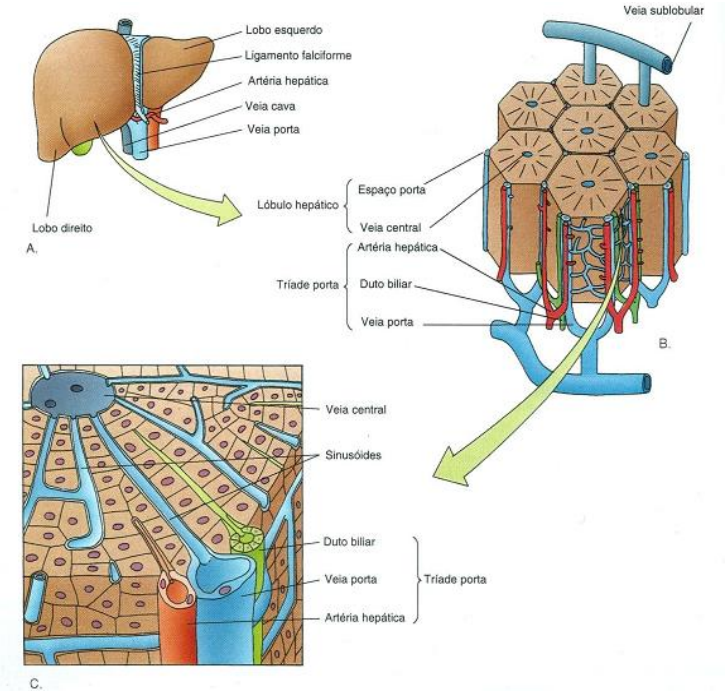
O fígado, é um órgão do sistema digestório e a maior glândula do corpo humano, em particular desempenha um papel chave no metabolismo, na desintoxicação e a síntese de proteínas (CICERO; COLLETTI; BELLENTANI, 2018). Situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, é um órgão multifuncional que atua tanto como glândula exócrina como endócrina no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para serem utilizados por outros órgãos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Trata-se de um órgão constituído por hepatócitos, correspondendo a 80% da população celular e extremamente vascularizado, recebendo aproximadamente 75% do suprimento de sanguíneo da veia porta e o restante, deriva da artéria hepática. Os hepatócitos organizam-se em placas

interconectadas, os lóbulos hepáticos, constituindo estes a unidade estrutural e funcional básica do fígado. Os lóbulos encontram-se em contato com pequenos ramos da vênula portal terminal e da arteríola hepática terminal, conferindo-lhe uma estrutura altamente irrigada e capaz de regenerar-se (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Neste sentido, a partir dessas vênulas e arteríolas, o sangue flui para os sinusóides hepáticos, vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas e células de Kupffer, que são macrófagos teciduais, situados entre as lâminas hepáticas. Abaixo desse revestimento existe o espaço perissinusoidal de Disse que separam os hepatócitos do revestimento sinusoidal onde ocorre a troca de nutrientes. O fígado também é drenado por um suprimento rico de vasos linfáticos que se conectam com os espaços de Disse nos septos interlobulares de forma que o excesso de liquido do espaço Disse que não foi absorvido pelos hepatócitos sejam drenados para circulação linfática (BEN Z. STANGER, 2015). Conforme a figura 2.

Figura 2: Desenho esquemático do fígado



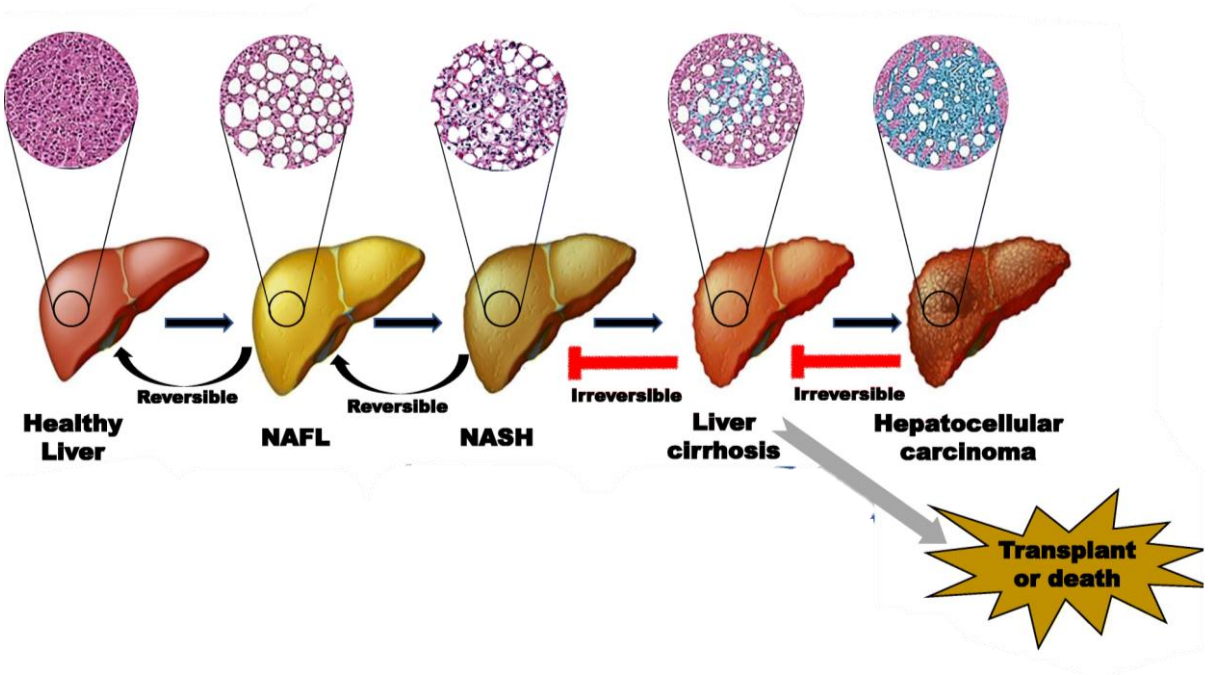
Fonte: GARTNER; HIATT, 2007

Nota: A – Anatomia macroscópica do fígado. B – Lóbulos hepáticos. C – Parte de um lóbulo hepático em maior aumento.

Assim, a integridade do fígado, bem como sua funcionalidade é essencial para as suas principais funções. Em geral, as patologias que acometem este órgão podem progredir de aguda à crônica(LIMA et al., 2018). O dano hepático que cursa para cronificação pode ser induzido por vírus (hepatites virais), esteatose hepática alcoólica (consumo de etanol por longo período) e a esteatose hepática não alcoólica, esta última vem se tornando uma importante causa de morbimortalidade relacionada à doenças do fígado(MASUOKA; CHALASANI, 2013).

A NAFLD consiste no acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, com alterações persistentes das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (YOUNOSSI et al., 2018). Essa patologia apresenta uma esteatose simples micro e/ou macro vesicular que pode progredir para esteatohepatite não alcoólica (NASH) apresentando modificações morfológicas (balonização), inflamação e fibrose(PADOIN et al., 2008). Tratando-se de uma doença progressiva, estudos têm mostrado que a NAFLD leva a formas mais graves da disfunção hepática, como cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) conforme exemplifica a figura 3 (WEISS; RAU; GEIER, 2014)

Figura 3: O desenvolvimento da NAFLD



Fonte: WANG et al. (2020)

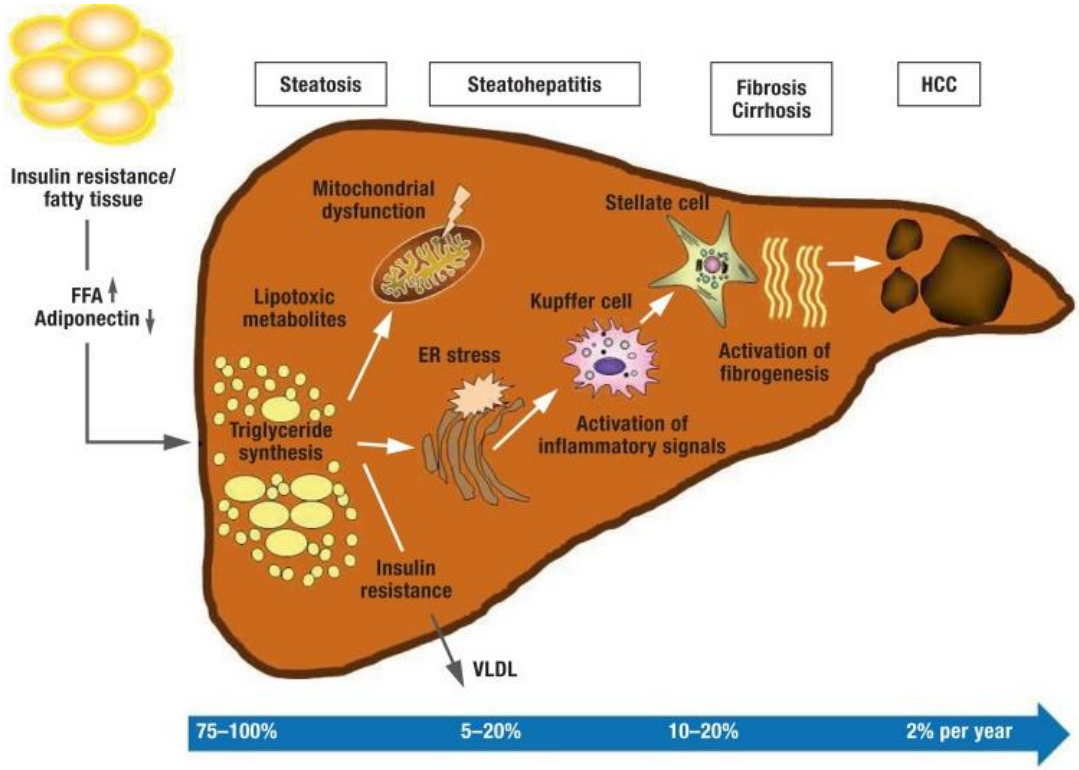
Nota: O desenvolvimento da NAFLD é dividido em quatro estágios: esteatose simples (NAFL), NASH, cirrose hepática e eventualmente HCC. Healthy liver = Fígado saudável; NAFL = Fígado gorduroso não alcoólico; NASH = Esteatohepatite não alcoólica; Liver cirrhosis = Cirrose hepática; Hepatocellular carcinoma = Carcinoma hepatocelular; Transplant ou death = Transpalnte ou morte; Reversible = Reversível; Irreversible = Irreversível.

A patogênese da NAFLD ainda não é muito compreendida, é sabido que o efeito combinado da resistência à insulina (RI), do estresse oxidativo, e da cascata inflamatória, desempenham um papel importante na patogênese da NAFLD e a sua progressão(PIAZZOLLA; MANGIA, 2020). A teoria *"two hits"* tem sido proposta para fisiopatologia da NAFLD. O primeiro "hit" é caracterizado por um desbalanço no metabolismo lipídico como uma consequência da RI. Como condição inicial, a hiperinsulinemia promove o aumento da lipólise e a liberação de ácidos graxos livres (FFAs) do tecido adiposo na circulação, além disso, também a lipogênese *de novo* de outras fontes de nutrientes, como os carboidratos(AHMED, 2015) e que são então

absorvidos pelo fígado. Promove-se, portanto, um desequilíbrio em que o influxo de ácidos graxos excede o efluxo hepático, resultando esteatose.

O segundo “hit” envolve a peroxidação lipídica, a disfunção mitocondrial, mediadores inflamatórios levando a danos a células e por uma série de interações complexas entre os hepatócitos, células de Kupffer e adipócitos, resultado na NASH. A inflamação crônica contribui para progressão da lesão hepática e, a longo prazo, para o desenvolvimento de fibrose e cirrose como mostrado na figura 4 (WEISS; RAU; GEIER, 2014). Por outro lado, os hábitos alimentares podem modular a esteatose hepática, de forma que uma dieta rica em gordura saturada promove um maior acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, o que é considerado como um marcador chave da NAFLD, e aumento dos níveis de insulina no plasma, induzindo a resistência à insulina e por consequência afetando a função mitocondrial.

Figura 4: Patogênese da NAFLD



Fonte: Weiß J, et al. (2014)

Nota: Patogênese e curso clínico da doença hepática gordurosa não alcoólica. A figura mostra as frequências dos estágios individuais da doença. Patogênese: uma parte importante na patogênese da NAFLD é desempenhada pela resistência à insulina, estresse oxidativo e cascata inflamatória. Insulin resistence = Resistência à insulina; Fatty tissue = Tecido adiposo; FFA = Ácidos graxos livres; Adiponectin = Adiponectina; Steatosis = Esteatose; Steatohepatitis = Espeatohepatite; Fibrosis = Fibrose; Cirrhosis = Cirrose; HCC = Carcinoma hepatocelular; Triglyceride synthesis = Síntese de triglicerídeos; Lipoxic metabolites = Metabólicos lipotóxicos; Mitochondrial dysfunction = Disfunção mitocondrial; ER stress = estresse do retículo endoplasmático; Kpffer cell = Célula de Kupffer; Stellate cell = Célula estrelada; Activation of inflammatory signals = Ativação de sinais inflamatórios; Activation of fibrogenesis = Ativação da fibrogênese.

3.1.1.1 Metabolismo Lipídico e NAFLD

O fígado desempenha um papel importante no metabolismo dos lipídios, participando da β-oxidação, síntese de triglicerídeos (TGs) e colesterol, bem como na secreção de lipoproteínas. O acúmulo de gordura no fígado, representado principalmente por triglicerídeos, é resultante do aumento do fornecimento de ácidos graxos livres do tecido adiposo periférico para o fígado e da lipogênese *de novo* através da via lipogênica. Por outro lado, no fígado estes ácidos graxos, podem ser oxidados pela β-oxidação mitocondrial ou incorporados a partículas de VLDL (very low density lipoprotein) para exportação (EL-ZAYADI, 2008). Diante disso, qualquer desequilíbrio entre esses processos pode levar ao desenvolvimento da NAFLD(MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009).

Outro aspecto importante para o desenvolvimento da esteatose é a resistência à insulina, responsável pela manutenção da homeostase da glicose(CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A presença de altos níveis de insulina circulantes leva ao aumento da produção de glicose hepática e estimula o processo de síntese endógena de ácidos graxos (FAs) no fígado (lipogênese *de novo*). Ocorre ativação de genes que codificam as enzimas que participam na conversão do excesso de glicose em acetil-CoA, seguida da

sua conversão em malonil-CoA pela enzima acetil CoA carboxilase (ACC) (BROWNING et al., 2004). Em seguida, a enzima sintase de ácido graxo (FAS), utiliza tanto acetil-CoA e o malonil-CoA para formar ácido palmítico (DORN et al., 2010; SPRADLEY et al., 2018).

A ativação dessas enzimas lipogênicas é mediada pelo fator de transcrição Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP – 1c)(FERRÉ; FOUFELLE, 2010). O SREBP-1c é predominante no fígado e a transcrição é induzida por dois estímulos: a insulina, que conduz um aumento paralelo tanto do precursor de SREBP-1c, quanto da sua translocação para o núcleo; e o receptor X do fígado (LXRα) que também tem papel importante na transcrição de genes lipogênicos, estimulando o acúmulo de triglicerídeos no hepatócito(SPRADLEY et al., 2018). Neste contexto, essas enzimas apresentaram uma maior expressão na NAFLD, sugerindo suas ações como possíveis marcadores para o diagnostico ou alvo terapêutico para NAFLD (DORN et al., 2010; SPRADLEY et al., 2018).

Em resumo, a obesidade principal fator de risco para o desenvolvimento da NAFLD, comumente está associada à hiperinsulinemia inicial, o que promove a hiperativação do SREPB-1c e consequente síntese hepática de lipídios (TER HORST; SERLIE, 2017). Posteriormente, a resistência à insulina no tecido adiposo impulsiona o fluxo de ácidos graxos derivados da lipólise do tecido para o fígado contribuindo para a esteatose hepática (GAGGINI et al., 2013). Portanto, para controlar a progressão da NAFLD, é importante compreender os mecanismos de regulação do acúmulo de lipídios hepáticos (BROWNING et al., 2004).

3.1.1.1.1 A inflamação e a NAFLD

A inflamação durante a NAFLD pode ser desencadeada por vários fatores. A lipotoxicidade é o termo utilizado para definir lesão ou morte celular causada pela disponibilidade excessiva de ácidos graxos livres e seus metabólicos(Neuschwander-Tetri, 2010). A produção desregulada de FFAs pode resultar em acúmulo de TGs no fígado e pode ser prejudicial ao hepatócito, por iniciar um processo de resistência à insulina. Os mecanismos

de redução da sinalização da insulina podem incluir redução da expressão e atividade do receptor de insulina, redução da ativação do substrato do receptor de insulina (IRS), além da ativação da c-Jun N-terminal cinase (JNK), que inibe a ativação do IRS por fosforilar resíduos de serina. Além disso, o acúmulo de ácidos graxos e seus metabólitos pode promover o estresse lipotóxico do retículo endoplasmático, que por sua vez ativa o estresse oxidativo (LACERDA; BOCK; FUNCHAL, 2015). O estresse oxidativo tem um papel chave no desenvolvimento da inflamação, sendo a mitocôndria a responsável pela indução e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a β-oxidação de ácidos graxos(KOEK; LIEDORP; BAST, 2011).

Por outro lado, outros fatores também podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação hepática. Indivíduos com NAFLD apresentam maior volume do tecido adiposo (TA), considerado um órgão com funções metabólicas, endócrinas e imunológicas (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2017). A hipernutrição pode desencadear alterações metabólicas como resistência à insulina, dislipidemia e mudanças no padrão de secreção de adipocinas, que representam o conjunto de citocinas secretadas pelo TA.

Em respostas às adipocinas e fatores quimiotáticos liberados, há o aumento do número dos macrófagos no TA, que na obesidade está associado ao perfil M1, que é caracterizado pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e as interleucinas 6 e 2 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). O excesso de TNF-α estimula a lipólise e, consequentemente, aumenta o fluxo de ácidos graxos na circulação que são transportados para ao fígado (PARKER, 2018). Além disso, o TNF-α tem sido relacionado ao desenvolvimento da inflamação hepática (FAIN et al., 2004; STANTON et al., 2011).

Outro fator sistêmico que pode influenciar no processo inflamatório hepático é a presença de lipopolisacarídeos (LPS), endotoxina derivadas de bactérias do intestino. Estudos têm demonstrado, que indivíduos com NAFLD apresentam alterações na integridade do endotélio intestinal e isso faz com que os LPS atinjam a circulação portal hepática e induz a inflamação (FUKUI, 2016). Durante este processo, as células que fazem parte da imunidade inata

hepática, incluindo células de Kupffer que tem a capacidade de fagocitar endotoxinas e, depois da sua ativação liberarem citocinas (TNF-α, IL-1 e IL-6), bem como as quimiocinas que iniciam a resposta de forma aguda.

Após a lesão hepática, as células imunes possuem um importante papel na regeneração tecidual. Em condições fisiológicas, esse mecanismo consegue substituir os hepatócitos submetidos à morte celular. No entanto, quando esse processo falha, por exemplo na obesidade crônica, colabora para a progressão do dano hepático (CAZANAVE; SANYAL, 2015; CHEUNG; SANYAL, 2008). A disponibilidade excessiva das citocinas pro-inflamatórias produzidas pelas células de Kupffer pode contribuir para o processo fibrótico (BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013). As citocinas podem interagir diretamente com as células estreladas hepáticas (HSCs) via TGF-β, contribuindo para a diferenciação dessas células em miofibroblastos e produção de colágeno resultando em regeneração tecidual (TACKE, 2012), um mecanismo chave encontrando em várias doenças hepáticas agudas e crônicas (WEISS; RAU; GEIER, 2014).

Por outro lado, as células dendríticas hepáticas, são responsáveis pela apresentação do antígeno no fígado e em condições patológicas produzem citocinas como IL-12 e TNF-α(DE CREUS et al., 2005). Os neutrófilos alteram seu fenótipo e liberam sinais citotóxicos como ROS, quimiocinas e entre outros para atrair outros neutrófilos e monócitos para o local da inflamação(SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). Vale ressaltar ainda que o fígado é infiltrado por células natural killer (NK) e Natural Killer derivadas de células T (NKT) que são responsáveis pela defesa contra patógenos, promovendo alterações intracelulares, que pode resultar em morte ou lise dos hepatócitos(CLAṘIA, 2012).

3.2 EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-FÍGADO

3.2.1 Microbiota e NAFLD

Recentemente, evidências sugerem que o eixo microbiota-intestino-fígado desempenha um papel critico no início e na progressão das doenças hepáticas crônicas (BRANDT et al., 2017; ZHANG et al., 2018). A microbiota

do trato gastrointestinal contém aproximadamente 10^{14} unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias (FEROLLA et al., 2014, 2015) e mantém uma relação de simbiose com o hospedeiro contribuindo para diversas funções como digestão, síntese de vitaminas e bloqueio da colonização intestinal por patógenos(THURSBY; JUGE, 2017). As concentrações das bactérias dentro do trato gastrointestinal dependem de fatores relacionados à espécie e às condições de colonização, tais como motilidade, pH, pressão de oxigênio e disponibilidade de nutriente (SIVANAND, 2019) .

Apesar da diversidade bacteriana, quatro filos principais estão presentes no intestino, *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria*, sendo que até 90% destas bactérias pertencerem aos filos *Firmicutes e Bacteroidetes* (SALTZMAN et al., 2018). Estudos recentes mostraram que indivíduos com NAFLD apresentam menor diversidade da microbiota em comparação de indivíduos saudáveis(HRNCIR et al., 2021; SHEN et al., 2017; TILG; CANI; MAYER, 2016), afetando a permeabilidade e inflamação intestinal (NI et al., 2022). Essa disbiose intestinal pode ser influenciada pela dieta, idade, peso corporal, medicamentos (LEUNG et al., 2016; RINELLA, 2015; ZHENG et al., 2018). No entanto, as associações entre esses fatores e o desenvolvimento ou progressão da NAFLD ainda são controversos.

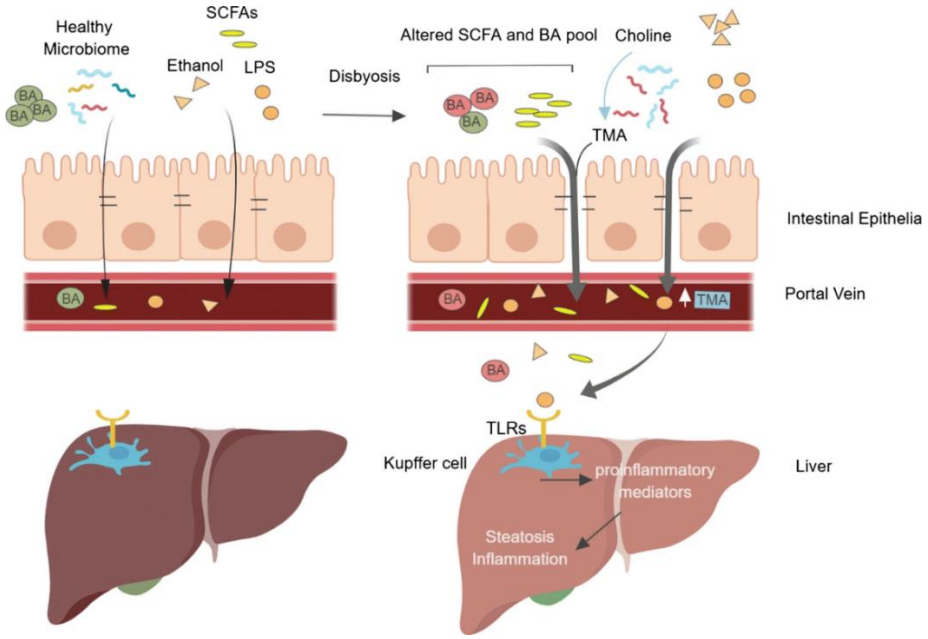
A disbiose ocorre se a homeostase bacteriana sofrer quaisquer alterações na composição e diversidade ou em suas funções metabólicas. Le Roy et al., 2013, foram os primeiros a demonstrar que composição da microbiota intestinal determina o desenvolvimento de NAFLD em camundongos da linhagem C57BL/6. Em um outro estudo, a microbiota intestinal de pacientes com NAFLD foi comparada com a de indivíduos magros, e foi observado um aumento do filo *Firmicutes* e uma redução do filo *Bacteroidetes* nos indivíduos com NAFLD (ISHIOKA et al., 2017; LIU et al., 2016). Ademais, as composições do microbioma intestinal foram associadas à NAFLD leve ou moderada e fibrose grave, sendo *Firmicutes* mais prevalente em NAFLD leve ou moderada, e *Proteobacteria* mais prevalente na fibrose hepática (LOOMBA et al., 2017).

A permeabilidade intestinal é capaz de manter o controle da homeostase local. Alguns fatores, incluindo a camada de muco, peptídeos antimicrobianos e a rede de proteínas tight junction (TJ), são responsáveis para manter a função da barreira intestinal(SAFARI; GÉRARD, 2019). Estudos com animais que receberam dieta rica em sacarose e gordura, mostraram redução de ocludina que é uma importante proteína TJ intestinal, aumento dos níveis de LPS e aumento da deposição de gordura hepática (ZHOU et al., 2014)

Os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) são produzidos pela microbiota, incluindo acetato, propionato e butirato, que são produzidos por fermentação a partir de fibras, e estão envolvidos no controle do perfil lipídico e estimulando a produção do peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1)(LEUNG et al., 2016; SCHOELER; CAESAR, 2019). Os SCFAs regulam o metabolismo hepático e melhoram a esteatose hepática por meio das vias de sinalização que modulam o apetite e a inflamação no eixo intestino-fígado (ALBILLOS; DE GOTTARDI; RESCIGNO, 2020). Além disso os SCFAs são rapidamente absorvidos pelas células epiteliais do intestino, onde estão envolvidos com a transcrição de genes das junções do tipo tight, tais como a ocludina, claudina e a zonula ocludens(THURSBY; JUGE, 2017). Portanto, a síntese alterada de ácidos graxos de cadeia curta pode resultar em deterioração da integridade e permeabilidade intestinal que são fatores que contribuem na progressão da NAFLD (WANG et al., 2016).

Em decorrência da translocação do LPS, no fígado há ativação da resposta inflamatória por meio da ativação da via TLR4/NF-ĸB, e consequentemente, há produção de citocinas e a produção de espécies reativas do oxigênio(XUEFENG CHEN, ET AL; REITER; MCREE, 2011). Além disso, essa via TLR4 também pode ser ativada por ácidos graxos saturados presentes nos alimentos que, devido à semelhança estrutural aos do LPS, são capazes de ativar o TLR4 o que contribui para a lesão hepática(HUANG et al., 2012). O papel da microbiota no desenvolvimento e progressão da NAFLD é mostrado na figura 5.

Figura 5: Permeabilidade intestinal no desenvolvimento e progressão da NAFLD



Fonte: SAFARI, et al. (2019)

Nota: Visão esquemática do papel do microbiota na permeabilidade intestinal e no desenvolvimento da NAFLD. No lado esquerdo, os componentes do eixo intestino-fígado estão operando normalmente; no lado direito, o status NAFLD é mostrado. Healthy microbiome = Microbiota saudável; Intestinal Epithelia = Epitélio intestinal; Portal Vein = Veia porta; Liver = Fígado; Kupffer cell = Célula de Kupffer; TLRs = Receptores Toll Like; proinflammatory mediators = Mediadores pro – inflamatórios; Steatosis = Esteatose; Inflammation = Inflamação; Ethanol = Etanol; SCFAs = Ácidos graxos de cadeia curta; LPS = Lipopolisacarídeos; BA = Ácidos biliares; Disbyosis = Disbiose; Choline = Colina; TMA = trimetilamina; Altered = Alteração.

Portanto, existe uma correlação positiva entre a disbiose intestinal e seus metabólicos no metabolismo hepático de carboidratos e lipídios, bem como na ativação da inflamação, afetando diretamente a patogênese da NAFLD e a sua progressão (KOLODZIEJCZYK et al., 2019). Atualmente, pesquisas científicas tentam propor intervenções terapêuticas para NAFLD por meio da modulação da microbiota intestinal, como a suplementação de

probióticos, prebióticos, a combinação de ambos (simbióticos), e o transplante de microbiota fecal (FMT) (CHEN; VITETTA, 2020).

3.3 PREBIÓTICOS

Os nutrientes são capazes de assegurar a saúde, reduzir o risco de doenças e podem apresentar efeito terapêutico frente a determinados processos. Os alimentos com tais características são denominados funcionais e dentre eles podem-se destacar os probióticos, prebióticos e simbióticos. O vocábulo “probiótico” significa “pela vida” e caracteriza um suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, o que inclui bactéria lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas que, quando consumidos em quantidades adequadas, melhoram a saúde do hospedeiro (KAREB; AÏDER, 2019). O consumo de produtos probióticos pode melhorar os movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes e prevenindo ou controlando infecções intestinais

Por sua vez, os prebióticos são definidos como fibras alimentares (consistem fundamentalmente em polissacarídeos não-amido e oligossacarídeos resistente à digestão pelas enzimas humanas) que estimulam o crescimento e/ou a atividade da microbiota gastrointestinal, cuja modulação está associada beneficamente com a saúde do indivíduo (AZIMIRAD et al., 2016; GIBSON et al., 2010; ROBERFROID, 2007). Para exercer essas funções, algumas características são importantes: resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas digestivas, e à absorção no trato gastrointestinal (Wilson; WHELAN, 2017; ROBERFROID, 2007).

Vários estudos têm demonstrado os benefícios dos prebióticos em modelos experimentais e clínicos. Os prebióticos podem reduzir a incidência de doenças, tais como neoplasias, diabetes, NAFLD e infecções. Também podem promover a modulação na resposta imunológica. Além disso, o consumo de prebióticos estimula a produção de SCFAs (acetato, propionato e butirato) que ativam diretamente os receptores acoplados a proteína G (GPR41,GPR43 e GPR109) (ANG; DING, 2016; KOH et al., 2016; LU et al., 2016)

GPR41 e GPR43 são expressos não só em enterócitos intestinais, mas também em outros tipos celulares e tecidos, como fígado, musculatura, neurônios entéricos e também em células do sistema imunológico, sendo um forte indício da amplitude de seus efeitos no organismo. O GPR43 é expresso pelas células L intestinais, quando ativado estimulam secreção de incretinas, peptídeo YY (PYY) e o GLP-1. A liberação do GLP-1 reduz o acúmulo de gordura no tecido adiposo, levando ao aumento da sensibilidade à insulina (HIDEAKI et al., 2009).

O GPR109A, encontrado na superfície do epitélio intestinal e células imunes, desempenha um papel fundamental no controle da permeabilidade intestinal e da cascata inflamatória. A ausência de receptores GPR109A está associada à diminuição da concentração de proteínas das tight junctions, levando ao aumento da permeabilidade intestinal e suscetibilidade à inflamação. Por sua vez estudos mostram que o butirato atua via GPR109A para aumentar a transcrição gênica de Zonula Occludens-1 (ZO-1), ocludina e claudina-3, aumentando portanto, sua síntese e consequnetmente, melhorando a permeabilidade intestinal (KARUNARATNE et al., 2021). Além disso, a ativação dos GPRs é capaz de ativar diretamente as enzimas quinases, como Proteína quinase C (PKC), MAP Quinase (MAPK) e Proteína quinase A (PKA), que aumentam a fosforilação da ZO-1, o que permite a sua melhor conexão com as demais proteínas das tight junctions (PÉREZ-REYTOR et al., 2021).

Os SCFAs também possuem propriedades anti-inflamatórios no intestino através da inibição das vias de sinalização envolvendo NF-κB nuclear e inibição da histona desacetilase (KNUDSEN et al., 2018). Em um modelo de Camundongos com colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), o butirato de sódio melhorou a resposta inflamatória e a disfunção da barreira do epitélio intestinal através da ativação de GPR109A e inibição das vias de sinalização AKT e NF-κB p65 (CHEN et al., 2018). Além disso,os SCFAs têm capacidade de influenciar a expressão da interleucina anti-inflammatória IL-10 em macrófagos e em células dendríticas intestinais *in vitro* (SINGH et al., 2014).

Atualmente, os prebióticos mais estudados e utilizados comercialmente são inulina, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e lactulose. Destes, a inulina e os frutooligossacarídeos estão entre os mais promissores prebióticos (AZIMIRAD et al., 2016). Assim, para garantir um efeito benéfico para saúde do indivíduo, o consumo de prebióticos devem ser em doses diárias a partir de 4 até 20 g ingeridos diariamente durante pelo menos 15 dias (SAAD, 2006).

3.3.1 Frutooligossacarídeos (FOS)

Frutooligossacarídeos pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos, ou seja, que compreendem polímeros naturais formados por frutose, encontrados nos alimentos tais como: chicória, alho, alcachofra, aspargo, cebola e trigo são alguns exemplos (DI BARTOLOMEO; VAN DEN ENDE, 2015). No entanto, as concentrações em que estão presentes nestes alimentos são baixas para exercer um efeito significativo (LIMA, 2011). Os FOS podem ser obtidos pela extração de vegetais, o que economicamente inviável pelo seu alto custo, ou ainda, podem ser produzidos industrialmente por meio de duas técnicas, a primeira envolve hidrólise enzimática da inulina, que é um polissacarídeo de frutose com uma unidade de glicose terminal. A segunda forma, é a partir da sacarose por meio de hidrólise e síntese enzimática. A aplicabilidade do FOS em diversos alimentos é bastante ampla devido as suas características químicas serem positivas e por não alterarem as características organolépticas dos produtos (MACEDO; VIMERCATI; ARAÚJO, 2020; PASSOS; PARK, 2003).

Os benefícios dos FOS para a saúde humana têm sido estudados e dados indicam que mais de 8 g / dia de FOS são necessários para elevar de forma significativa a quantidade de bifidobactérias no trato gastrointestinal e doses inferiores a 5 g são consideradas ineficazes (GIBSON et al., 2004). A fermentação de FOS induz a produção de SCFAs que são fontes de energia para desenvolvimento de *Bifidobactérias* e *Lactobacilos*. Estudos anteriores relatam que FOS aumentam a abundância relativa de *Bifidobacterium* em camundongos BALB/c e C57BL/6J e favorece a produção de mucina no cólon (GU et al., 2022; WANG et al., 2017).

Dentre outros benefícios atribuídos à ingestão oral de FOS estão: uma redução do pH luminal, contribuindo para uma melhor absorção de minerais cálcio, magnésio, ferro, zinco e cobre, demonstrando o papel importante na manutenção da saúde dos ossos (ARJMANDI et al., 2011; KAREB; AÏDER, 2019; LOBO et al., 2014); redução do estresse oxidativo e da IL-1 no cólon (EVERARD et al., 2011); redução da glicose sérica em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012); modulação do sistema imune e alívio da constipação (SABATER-MOLINA et al., 2009). Além disso, em um estudo experimental de oferta de frutanos na composição da dieta, foi observado melhora da integridade intestinal e na inflamação sistêmica em camundongos obesos (LIU et al., 2016b).

3.3.1.1 Galactooligossacarídeos (GOS)

GOS é o termo utilizado para um grupo de carboidratos composto por moléculas de galactose ligada à lactose. A formação de GOS ocorre a partir de um substrato rico em lactose, uma importante substância ativa no leite e, é apontado como um fator que protege contra a patogenicidade de bactérias intestinais (FANARO et al., 2005; MISTRY et al., 2020; TIAN et al., 2019). Os galactooligossacarídeos podem ser divididos em α-galactooligossacarídeos (α-GOS) e β-galactooligossacarídeos (β-GOS) devido às diferentes ligações galactosídicas (TIAN et al., 2019), sendo o β-GOS, mais utilizado na pesquisa e produção comercial. Atualmente existem poucos estudos sobre α-GOS(MEI; YUAN; LI, 2022).

O GOS possui poucas fontes na natureza, encontrado em sementes de leguminosas, porém é difícil de separar e extrair dos demais componentes naturais. Atualmente, os métodos de produção de GOS envolvem a hidrólise da lactose e a posterior síntese enzimática, pela transglicosidase da β-galactosidase. Portanto, a síntese de GOS pode ser influenciada por diversos fatores, como a fonte de enzima, concentração de lactose, composição do substrato e condições de reação, etc (FEWTRELL et al., 2007; HE et al., 2021; WEIJERS; FRANSSEN; VISSER, 2008).

No colón, GOS reduz o número de bactérias patogênicas, através da inibição de sítios de ligação das bactérias na superfície dos enterócitos (DWIVEDI et al., 2016). Além disso, estimula efetivamente o crescimento dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta, melhora a função de barreira da mucosa e o metabolismo de lipídios (HE et al., 2021). Em um estudo com 44 idosos que receberam β-GOS (5,5 g/d), apresentou efeitos significativos sobre o sistema imunológico, evidenciado por uma melhora na fagocitose, na atividade das células NK, na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e redução significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1β e TNF-α (VULEVIC et al., 2008)

Recentemente, foi demonstrado que camundongos que receberam suplementação com GOS, apresentaram redução do peso corporal e a taxa de absorção intestinal de gordura (MISTRY et al., 2020). Este efeito também poderia ser atribuído ao GLP-1, que pode diminuir a produção intestinal de quilomícrons por meio de um eixo intestino-cérebro (FARR et al., 2015). Além disso, estudo clinico 44 pacientes o tratamento com 3,5 g / dia de GOS, resultou na melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável (VULEVIC et al., 2008).

3.3.1.1.1 Prebióticos e NAFLD

Estudos realizados em modelos animais e ensaios clínicos demonstraram que prebióticos podem reduzir a patogênese da NAFLD (CHEN; VITETTA, 2020). Por exemplo, o uso de prebióticos alteram a microbiota intestinal e, portanto, melhoram o peso corporal, o metabolismo lipídico, a RI e a inflamação crônica, e consequentemente, o torna um importante alvo de intensa discussão para o tratamento da NAFLD (SUN et al., 2018). Em um estudo piloto com sete pacientes com NASH (confirmado por biópsia), o tratamento com 16 g / dia de oligofrutose (frutanos do tipo inulina) na dieta por 8 semanas reduziu significativamente os marcadores inflamatórios hepáticos (DAUBIOUL et al., 2005).

Em estudos realizado com ratos foi demonstrado redução dos níveis de lipídios plasmáticos e a concentração hepática de triglicerídeos quando tratados com inulina como suplemento dietético por 4 semanas. Resultados similares foram obtidos com a administração de frutose diluída na água por apenas 48 horas. É possível que esses efeitos sejam devido à redução da síntese de ácidos graxos através da diminuição da expressão gênica de enzimas na via da lipogênese (KOK; ROBERFROID; DELZENNE, 1996; SUGATANI et al., 2006).

Similarmente, Pachikian e cols demonstraram que o tratamento de camundongos com o prebiótico FOS 0,25 g /dia, também melhorou os distúrbios metabólicos e hepáticos induzidos por uma dieta hipercalórica, sugerindo seu papel benéfico. De acordo com esses autores, a redução do acúmulo de triglicerídeos no fígado está associada à oxidação estimulada de ácidos graxos via receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-alfa) e inibição do SREBP-1c que controla a expressão das enzimas lipogênicas (PACHIKIAN et al., 2013).

Em suma, os efeitos de prebióticos na manutenção da integridade do trato gastrointestinal, e na redução da lipogênese *de novo* através da modulação gênica de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, sugerem que os prébioticos possuem ações farmacológicas benéficas na regulação metabólica do organismo, e portanto, são uma possível estratégia terapêutica para tratamento e prevenção da NAFLD, no entanto alguns mecanismos ainda precisam ser elucidados. O presente estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos dos prebióticos (frutooligossacarídeos [FOS] e galactooligossacarídeos [GOS]) na fisiopatologia da doença do fígado gorduroso não-alcoólico (NAFLD) em modelo experimental de obesidade induzido por dieta através de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

PREBIÓTICOS REDUZEM A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA AO MODULAR A MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS OBESOS

Autores: Rodrigo Soares da Silva[1,2], Ingrid Prata Mendonça[1,2], Igor Henrique Rodrigues de Paiva[1,2], José Roberto Botelho de Souza[3], Christina Alves Peixoto[1]

[1] Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), PE, Brasil.

[2] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

[3] Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente: endereço de e-mail: rodrigosoares321@gmail.com

Resumo

A obesidade e outros distúrbios metabólicos estão associados à doença do fígado gorduroso não alcoólica (NAFLD), que pode levar à cirrose e ao carcinoma hepatocelular. O eixo intestino-fígado-obesidade desempenha um papel central nas doenças metabólicas, e a disbiose intestinal tem sido associada à NAFLD e sua gravidade. Diante disso, avaliamos os efeitos de dois prebióticos disponíveis comercialmente (frutooligossacarídeos [FOS] e galactooligossacarídeos [GOS]) na inflamação hepática e na microbiota intestinal em modelo de NAFLD induzida por dieta rica em gordura. Inicialmente, os camundongos foram distribuídos nos seguintes grupos: (A) dieta padrão controle (n=15) e (B) HFD por 18 semanas (n=30). Na 13ª semana, os camundongos foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (A) Controle (n=15); (B) HFD (n=14); e (C) HFD+Prebióticos (n=14) e o grupo HFD+Prebióticos receberam uma dieta rica em gordura e uma combinação de FOS e GOS. Os resultados indicaram que FOS e GOS reduziram a resistência à insulina, hiperglicemia, trigliceridemia e colesterolemia. Além disso, FOS e GOS

melhoraram a arquitetura hepática e o acúmulo de gordura hepática modulando as vias lipogênica (SREBP-1c, ACC e FAS) e lipolítica (ATGL). O tratamento com FOS e GOS também reduziu marcadores inflamatórios como p-NFκB-65, IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α e IL-1β. Além disso, FOS e GOS atenuaram NAFLD modulando a composição da microbiota intestinal e fortalecendo a integridade da barreira intestinal, melhorando assim a via intestino-fígado subjacente aos efeitos benéficos no metabolismo lipídico hepático.

Palavras-chave: Obesidade; NAFLD; Disbiose, Prebióticos.

1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos supera 5% do peso hepático total na ausência do uso de álcool (Chalasani et al., 2018; Wong et al., 2017). A NAFLD está aumentando em todo o mundo, principalmente associada à prevalência de síndromes metabólicas como obesidade, diabetes, dislipidemia e hipertensão que afetam adultos, mas também crianças e adolescentes (Vos et al., 2017; Younossi et al., 2019). De acordo com dados recentes, a prevalência de NAFLD na população com sobrepeso ou obesidade na América do Sul foi estimada em aproximadamente 70,9% e ainda não possui farmacoterapia aprovada (Liu et al., 2022).

Em contraste, a epidemia de problemas metabólicos nos países desenvolvidos é alta e, na realidade atual, tem mostrado um aumento considerável da prevalência em pacientes com peso médio (Inoue et al., 2018; Stefan et al., 2017). Neste contexto, a manifestação hepática associada a distúrbios metabólicos (NAFLD) recebeu uma nova nomenclatura sugerida por especialistas internacionais: doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) foi sugerida como um termo abrangente mais apropriado (Eslam et al., 2020). O termo MAFLD, como NAFLD, varia de esteatose simples (NAFL) associada à resistência à insulina a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), mostrando esteatose acompanhada de inflamação (Friedman et al., 2018) que pode progredir para cirrose e câncer de fígado (Gill e Majumdar, 2020).

A obesidade tem sido bem caracterizada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de NAFLD (Velázquez et al., 2019). Embora a obesidade seja prevenida de várias maneiras, principalmente por meio de mudanças na dieta e atividade física (Lustig et al., 2022), o fracasso é notável, especialmente a longo prazo (Velázquez et al., 2019). Além disso, o estado obeso tem sido associado a alterações na microbiota intestinal (disbiose) e nas suas funções metabólicas (Bliesner et al., 2022) e estudos recentes em humanos e animais mostraram que a disbiose está associada à NAFLD e sua gravidade (Fan e Pedersen, 2021; Song e Zhang, 2022). Portanto, esses estudos fornecem evidências de que a microbiota intestinal desempenha um papel indispensável na esteatose hepática.

A comunicação do eixo intestino-fígado é bidirecional (Song e Zhang, 2022), devido à proximidade anatômica e intensa interdependência fisiológica (Albuquerque-Souza, 2022). O fígado recebe aproximadamente dois terços de seu sangue do trato gastrointestinal através da veia porta (Song e Zhang, 2022). No caso da NAFLD, o aumento da permeabilidade intestinal resulta no acesso de bactérias e endotoxinas, como lipopolissacarídeos (LPS) do intestino para o fígado, estimulando células imunes hepáticas, ativando vias de inflamação e eventualmente contribuindo para a progressão da NAFLD (Barrow et al., 2021; Xie e Halegoua-Demarzio, 2019).

Evidências emergentes sugerem que a microbiota intestinal pode ser um alvo terapêutico para NAFLD; tais tratamentos incluem prebióticos que alteram as composições microbianas intestinais (Gupta et al., 2022). Os prebióticos são definidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) como “um componente alimentar que confere um benefício à saúde do hospedeiro associado à modulação da microbiota”. Dada a definição proposta, estudos com oligofrutose como exemplo mostraram efeitos benéficos em pacientes com NAFLD, incluindo melhora na disbiose, permeabilidade intestinal, glicemia, inflamação e lipogênese hepática (Bomhof et al., 2019; Nadeau e Conjeevaram, 2017).

Portanto, a microbiota intestinal e seus metabólitos são estudados como prováveis fatores-chave na fisiopatologia da NAFLD. Novas abordagens terapêuticas para modular a microbiota intestinal por meio da administração de probióticos, prebióticos e simbióticos têm sido propostas com resultados promissores (Behrouz et al., 2020). Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de dois prebióticos disponíveis comercialmente (frutooligossacarídeos [FOS] e

galactooligossacarídeos [GOS]) na inflamação hepática e na microbiota intestinal na NAFLD induzida por dieta rica em gordura.

2. MATERIAIS E METÓDOS

2.1 Desenho Experimenral

O Comitê de Ética no Uso de Animais do IAM aprovou todos os procedimentos do presente estudo sob o parecer número 135/2018 CEUA-FIOCRUZ. Foram utilizados 45 camundongos C57BL6 wild-type (8-10 semanas), macho e pesando 20 g criados no biotério do Instituto Aggeu Magalhães. Eles foram aclimatados em ambiente de laboratório com temperatura de 22°C (±1°) e luz artificial de lâmpadas fluorescentes por um período claro/escuro de 12/12 horas e foram divididos em três grupos (Controle, HFD, HFD/Prebióticos (n= 15/grupo). Os animais foram submetidos a uma dieta padrão durante oito dias de adaptação. Após este período, o grupo controle recebeu uma dieta padrão (PragSolucões – AIN-93G) durante todo o período experimental, e o grupo HFD e HFD Grupo / Prebióticos receberam dieta hiperlipídica (HFD) composta por 60% de gordura (PragSolucões – AIN-93M) por 18 semanas e, a partir da 13 semana receberam a cominação de Fructooligosaccharide (FOS) + ®-Galactooligossacarídeo (B-GOS) (0,3g e 0,4g/camundongo/dia de FOS e GOS respectivamente) diluídos em água destilada (Burokas et al., 2017). Ao final, os animais foram anestesiados (cetamina/Xilazina) antes da coleta de sangue por punção cardíaca (sem anticoagulante) e o soro foram armazenados a -20°C para medições bioquímicas. Os fígados foram dissecados e fixados para posterior processamento (análise morfológica) e congelados a -80°C para posterior análise por western blotting.

2.2 Avaliações bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, e então o soro foi coletado para análises bioquímicas, incluindo colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinados por sistema enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Brasil). Os níveis de insulina foram

determinados usando kits ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (Elabscience, Wuhan, China).

2.3 Histopatologia

Fragmentos de fígado foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas antes de serem processados e incluídos em parafina. Os fragmentos foram cortados em 5µm e montados em lâminas histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e avaliados com as fotos captadas por meio de microscopia óptica (Leica ICC50-HD) com aumento de 400x.

2.4 Coloração Oil Red O

Para detectar especificamente lipídios, amostras de tecido hepático de cada animal (5 por grupo) foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 2 h e embebidas em O.C.T (Tissue-Tek, Zoeterwoude, Holanda) e congeladas a -80°C . Em seguida, cortes congelados (espessura de 8 µm) foram feitos em criostato e as amostras foram fixadas com solução de formaldeído puro por 15 min. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 60 segundos para identificação dos núcleos das células. As lâminas foram então lavadas em água destilada e coradas com Oil Red O por 15 min. A quantificação da densidade de pixels foi realizada em um painel por animal (n= 5 animais). Imagens do mesmo aumento (400x) foram analisadas quantitativamente usando o software Gimp 2.8 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX).

2.5 Imuno-histoquímica

Cinco cortes de fígado (5 µm de espessura) de cada grupo foram cortadas e aderidas a lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxi-silano (APES [Sigma, EUA]). Os cortes foram desparafinizados com xilol e reidratados em etanol graduado (100 a 70%). Para aumentar a exposição do epítopo, as seções foram aquecidas por 30 minutos em tampão citrato de sódio (0,01 M, pH 6,0). Para minimizar a atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram tratadas com 0,3% (v/v) de H_2O_2 em água por cinco minutos. Os cortes foram lavados com TBS-T e então bloqueados com 5%

BSA, 0,2% Tween 20 em PBS por 1h em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados por 12 horas a 4ºC com anticorpos contra ATGL (1:50 Abcam, Ab-99532 Cambridge, UK), COX-2 (1:400 Abcam, Ab15191 Cambridge, UK), iNOS (1:50 Abcam, Ab3523 Cambridge, Reino Unido), IL-6 (1:50 Abcam, Ab208113 Cambridge, Reino Unido). A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com avidina-biotina peroxidase (Dako Universal LSAB ® + Kit, Peroxidase), usando 3,3-diaminobenzidina como cromogênio. As lâminas foram contrastadas em hematoxilina. A coloração positiva resultou em um produto de reação marrom. Os controles negativos foram tratados como acima, mas com a omissão do primeiro anticorpo. Cinco fotos na mesma ampliação 400x foram analisadas quantitativamente usando o software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX).

2.6 Imunofluorescência

Cortes de fígado e cólon com uma espessura de 5 µm foram cortadas em um micrótomo RM 2035 (Reichert S, Leica) reidratadas e tratadas com tampão citrato 20 mM, pH 6,0, por 30 min. Em seguida, foram permeabilizados com Triton X-100 0,5% e incubados por 1h com solução bloqueadora (5% BSA mais 0,2% Tween 20 em solução salina tamponada com Tris). Posteriormente, os cortes hepáticos foram incubados com anticorpos contra SREBP-1c (1:200, Santa Cruz, sc-13551), FAS (1:100, Santa Cruz, sc-55580) ACC (1:50, Cell Signaling, cs- 36625) e seções de cólon com Ocludina (1:100, Santa Cruz, sc-133256). O anticorpo primário foi incubado durante a noite e então incubado com anticorpo policlonal conjugado 488 e 546 secundário contra imunoglobulina de coelho e camundongo por 1h. Os cortes foram lavados e montados em meio de gelatina e observadas sob um sistema de microscópio de fluorescência Leica DMI8 e processadas com o software Leica Application Suite LAS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As figuras foram exportadas como arquivos tiff com Adobe Photoshop versão 8. A densidade de pixels foi medida em cinco áreas maracdas usando o software GIMP 2.8.18 (software GNU Image Manipulation Program, CNET Networks, Inc. Austrália).

2.7 Western blot

Os fígados e cólons foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, quatro fragmentos de cada região do fígado de diferentes animais por grupo foram homogeneizados em uma solução de extração contendo coquetel de inibidores de protease (10mM EDTA, Amresco, Solon, EUA; 2mM fenilmetano sulfonil-fluoreto, 100mM NaF, 10mM sódio pirofosfato, NaVO4 10mM, 10 mg de aprotinina/ml e Tris 100mM, pH 7,4 – Sigma–Aldrich). As amostras foram misturadas e homogeneizadas para formar um pool de cada grupo. Os homogenatos foram centrifugados e congelados a -80 °C. Os níveis de proteína foram determinados usando o método de Bradford, com albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976) e 20 µg/µL da proteína total foram carregados em cada poço em um gel de eletroforese, separados e depois transferidos eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio por 1 h com soro de albumina bovina 5%, tween 20 0,01% e tampão fosfato salino, as membranas foram incubadas a 4º C durante a noite com os seguintes anticorpos: anti-IL-1β (1:1000, Ab9722 Abcam, EUA), anti-TNF-α (1:1000, Abcam Abcam, EUA), anti-NFkB-p65 (1:1000, sinalização celular cs-3033), anti- nitrotirosina (1:1000, Mab3248 R&D), anti-ocludina (1:1000, sc-133256 Santa Cruz) seguida de incubação com um anti-coelho conjugado com peroxidase (1:8000, A9169 Sigma-Aldrh, EUA) ou anti-rato (1:5000, A0161 Sigma-Aldrh, EUA) . O reagente de quimioluminescência (Milipore, número de catálogo: WBLUF0100) foi adicionado para visualização da banda da proteína e a reação foi detectada usando o equipamento do sistema iBright CL 1000 (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo: A44241). Para quantificação, os valores de densitometria foram obtidos medindo a densidade de pixels de cada banda usando o software Image J 1.38 (NIH, MD, EUA). Os resultados foram confirmados em três conjuntos de experimentos para cada proteína investigada. O imunoblot para β-actina (1:1000, A2228 Sigma-Aldrh, EUA) foi utilizado como controle endógeno.

2.8 Análise da microbiota baseada na sequência do gene 16S rRNA

O material fecal de seis camundongos por grupo foi coletado e processado coletivamente. Houve uma extração completa de DNA. Usando campos magnéticos

e o procedimento de extração padrão da Neoprospecta, o DNA foi extraído (Christoff et al., 2017). A preparação da biblioteca de sequenciamento para identificação bacteriana foi realizada utilizando os primers V3/V4 16S rRNA 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso et al., 2012; Wang e Qian, 2009). O sistema usando foi o padrão Illumina de primeira geração fornecido pelo kit do fabricante (Illumina, EUA). Os dados brutos do MiSeq foram processados usando um fluxo de trabalho da empresa Neoprospecta (Florianópolis – Santa Catarina) (Christoff et al., 2017). As primeiras páginas dos documentos Illumina FASTQ foram cortadas e seu erro cumulativo foi calculado (Phred 20). Além disso, clusters com abundâncias abaixo de 2 foram removidos. As classificações taxonômicas foram atribuídas usando um banco de dados com precisão de sequência 16S rRNA definida em um nível de identidade de 99% usando blastn v.2.6.0+ (Christoff et al., 2017).

2.9 Análise estatística

O software GraphPad Prism (versão 5) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos de controle e tratados foram analisadas usando análise de variância (ANOVA), antes da realização do teste de Dunnett ou post hoc de Tukey ou o teste t de Student. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1 FOS e GOS regulam parâmetros metabólicos em camundongos NAFLD induzidos por HFD

Parâmetros significativos da homeostase lipídica são mostrados na tabela 1. Em resumo, a alimentação HFD levou a um aumento significativo no colesterol total (CT), triglicerídeos (TGs), glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e níveis de insulina em comparação com o grupo controle: TC ($p < 0,0001$); TGs ($p < 0,0001$); glicose ($p < 0,0007$); HDL-c ($p < 0,0001$); LDL-c ($p = 0,0002$) e insulina ($p = 0,0033$). As alterações observadas nos

perfis lipídico e glicêmico podem contribuir como fatores de risco para o desenvolvimento da NAFLD. Conforme mostrado na Tabela 1, após a administração de FOS e GOS, os níveis de CT, TG e LDL-c no grupo HFD+Preb diminuíram significativamente em comparação com o grupo HFD: CT ($p < 0,0001$); TGs ($p = 0,0002$); LDL-c ($p = 0,0072$), indicando que FOS e GOS podem melhorar a dislipidemia induzida por HFD. Além disso, os níveis de insulina e glicose reduziram significativamente após seis semanas de tratamento ($p = 0,0416$) e ($p = 0,0002$), respectivamente.

3.2 Efeitos dos prebióticos FOS e GOS na histopatologia hepática

A análise histopatológica revelou que o grupo controle exibia arquitetura bem preservada com hepatócitos característicos distribuídos homogeneamente por todo o parênquima hepático (Fig. 1 - A). Após a indução à dieta hiperlipídica, o grupo HFD apresentou alterações significativas, incluindo desorganização tecidual com esteatose macro e microvesicular no citoplasma dos hepatócitos (Fig. 1 – B). O grupo que recebeu a dieta e foi tratado com FOS e GOS por seis semanas apresentou melhora significativa da arquitetura hepática, com redução da esteatose e também da inflamação, o que foi confirmado pela redução dos focos de infiltrados inflamatórios (Fig. 1 – C).

3.3 FOS e GOS diminuíram a deposição de lipídios no fígado

A coloração Oil Red foi usada para quantificar os lipídios no tecido hepático. O grupo controle apresentou quantidade basal de lipídios nos hepatócitos (Fig. 1 – D). O grupo HFD exibiu significativamente mais lipídios distribuídos no parênquima hepático em comparação com o controle ($p < 0,0001$) (Fig. 1 – E). O tratamento com FOS e GOS reduziu significativamente as gotículas lipídicas no tecido ($p < 0,0001$) (Fig. 1 - F). A análise quantitativa do conteúdo lipídico foi realizada em todos os grupos por meio dos testes ANOVA e post hoc de Tukey (fig. 1 – G).

3.4 Imunolocalização das vias lipogênica (SREBP-1c, ACC e FAS) e lipolítica (ATGL) após tratamento com FOS e GOS

A proteína de ligação do elemento regulador de esterol do fator de transcrição 1c (SREBP-1c) é um ativador lipogênico do fator de transcrição. A análise de imunofluorescência do tecido hepático do controle exibiu uma reatividade fraca ao SREBP-1c (Fig. 2 – A). O uso de uma dieta rica em gordura aumentou significativamente a característica de marcação citoplasmática do SREBP-1c quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0010$) (Figs. 2 – B e M). Por outro lado, o grupo tratado com FOS e GOS apresentou diminuição significativa na expressão de SREBP-1c quando comparado ao grupo HFD ($p < 0,0001$) (Figs. 2 – C e M).

Acetil-CoA carboxilase (ACC) é a principal enzima implicada na regulação da síntese de ácidos graxos. Após análise da expressão do ACC no tecido hepático, o grupo controle apresentou baixa reatividade ao ACC (Fig. 2 – D). O grupo HFD aumentou significativamente a reatividade ACC em comparação com o grupo controle ($p = 0,0010$) (Figs. 2 – E e N). FOS e GOS não reduziram a imunorreatividade do ACC em comparação com o grupo HFD (Figs. 2 – F e N).

A ácido graxo sintase (FAS) é uma enzima multienzimática que catalisa a síntese de ácidos graxos. O grupo controle apresentou baixa reatividade à enzima FAS (Fig. 2 – G). O grupo HFD revelou imunopositividade intensa em comparação com os grupos Controle e FOS e GOS ($p = 0,0010$; $p < 0,0001$, respectivamente) (Fig. 2 – H e O). FOS e GOS foram capazes de reduzir significativamente a expressão de FAS quando comparados ao grupo HFD ($p < 0,0001$) (Fig. 2 I e O).

Lipase de triglicerídeos adiposos (ATGL) é uma enzima chave envolvida na degradação intracelular de triacilgliceróis. O grupo FOS e GOS apresentou aumento na expressão de ATGL em relação ao HFD ($p < 0,0001$) (Fig. 2 – L e P), sugerindo possível ativação da via lipolítica. A análise quantitativa foi realizada usando ANOVA e testes post hoc de Tukey (Fig. 2 M, N, O, P).

3.5 FOS e GOS diminuíram os níveis de marcadores inflamatórios em camundongos com NAFLD

A expressão de IL-6 em imuno-histoquímica foi analisada após o tratamento com prebióticos. O grupo controle exibiu uma reatividade fraca à IL-6 (Fig. 3 – A). A dieta hiperlipídica aumentou significativamente a expressão de IL-6 no citoplasma dos hepatócitos quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figs. 3 – B e J). Os prebióticos não reduziram a imunorreatividade da IL-6 em relação ao grupo HFD (Figs. 3 – C e J).

Analisando a expressão da iNOS no tecido hepático, o grupo controle apresentou baixa reatividade à iNOS (Fig. 3 – D). O grupo HFD aumentou significativamente a reatividade à iNOS, marcando o citoplasma dos hepatócitos, indicando um aumento no processo inflamatório quando comparado aos grupos controle e HFD + PREB ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) (Figs. 3 – E e K). Após a administração de FOS e GOS, houve uma diminuição significativa na coloração de iNOS em todo o tecido hepático quando comparado com o HFD ($p < 0,0001$) (Figs. 3 – F e K).

A expressão de COX-2 foi avaliada por imuno-histoquímica após tratamento com FOS e GOS em camundongos C57BL/6 wild-type submetidos a dieta hiperlipídica. O grupo controle apresentou baixa reatividade à enzima COX-2 (Fig. 3 – G). Após exposição a uma dieta hiperlipídica, forte imunorreatividade à enzima COX-2 quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figs. 3 – G e L), o que indica que a alta a dieta gordurosa contribuiu para o processo inflamatório hepático. No entanto, após o uso de prebióticos, observou-se redução significativa da imunorreação para COX-2 quando comparado ao grupo HFD ($p < 0,0001$) (Figs. 3 – I e L). Esses resultados sugerem que os prebióticos podem estar envolvidos na redução do processo inflamatório. (J, K, L) A análise quantitativa foi realizada usando ANOVA e testes post hoc de Tukey.

O p-NF-κB contribui para o processo inflamatório hepático, ativando diversas citocinas. O presente estudo analisou os níveis desse fator de transcrição no tecido hepático após a administração de FOS e GOS. Conforme observado, o consumo de uma dieta hiperlipídica aumentou significativamente a expressão da proteína p-NF-κB no fígado (Fig. 4 – A) ($p = 0,0002$). No entanto, o grupo que recebeu dieta hiperlipídica e foi tratado com FOS e GOS resultou em expressão reduzida dessa

proteína ($p < 0,0001$) (Fig. 4 – A).

A expressão de TNF-α, um mediador pró-inflamatório, mostrou expressão aumentada foi altamente induzida por uma dieta rica em gordura no grupo HFD em comparação com os grupos controle e HFD + PREB ($p = 0,0038$) (Fig.4 – B). Após o tratamento, a expressão da proteína TNF-α diminuiu significativamente nos fígados de camundongos induzidos por dieta hiperlipídica tratados com prebióticos FOS e GOS ($p = 0,0038$) (Fig. 4 - B).

A IL-1β é outra citocina que desempenha um papel na inflamação e é necessária para o desenvolvimento de uma lesão hepática. A expressão de IL-1β no grupo HFD apresentou alta expressão proteica (Fig. 4 - C) quando comparada aos grupos controle e prebióticos ($p = 0,0056$). No entanto, o grupo submetido ao tratamento com prebióticos teve expressão significativamente reduzida em comparação ao grupo HFD ($p = 0,0056$) (Fig. 4 - C).

A expressão da nitrotirosina está relacionada com as condições fisiopatológicas no fígado. O grupo HFD apresentou altos níveis de expressão da proteína nitrotirosina (Fig. 4 – D) em comparação com os grupos controle e prebióticos ($p = 0,0052$; $p = 0,0032$, respectivamente). O nível de expressão da proteína nitrotirosina diminuiu significativamente nos fígados de camundongos tratados com prebióticos (Fig.4 – D) em comparação com o grupo HFD ($p = 0,0032$).

3.6 FOS e GOS melhoram a integridade intestinal em camundongos NAFLD induzidos por HFD

A fim de investigar os efeitos protetores dos prebióticos FOS/GOS na permeabilidade intestinal, os níveis de expressão de ocludina foram avaliados. O consumo de uma dieta rica em gordura reduziu significativamente a expressão da proteína ocludina no cólon (Fig. 5 – A e B) ($p = 0,0001$). FOS e GOS inibiram a diminuição da expressão de ocludina em comparação com o grupo HFD (Fig. 5 A e B) ($p = 0,0220$). Esses resultados sugerem que FOS e GOS podem reverter a permeabilidade intestinal induzida por HFD aumentando os níveis de expressão de ocludina.

3.7 FOS e GOS modulam a composição da microbiota intestinal em camundongos NAFLD induzidos por HFD

Ao sequenciar o gene 16S rRNA, analisamos os efeitos do uso de prebióticos na microbiota intestinal e sua ligação com o desenvolvimento de NAFLD. No nível do filo, camundongos alimentados com HFD tiveram maior abundância de Firmicutes (Fig. 6A). No entanto, esse perfil foi alterado pela administração de FOS e GOS. Os camundongos alimentados com HFD tiveram uma proporção maior de Firmicutes/Bacteroidetes em comparação com o grupo de tratamento ($p < 0,0001$) (Fig. 6B). Os prebióticos diminuíram a abundância de Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes e aumentaram a abundância de Bacteroidetes (Fig. 6A).

No nível do gênero, a intervenção da dieta rica em gordura aumentou a abundância de Desulfovibrio em comparação com camundongos controle e prebióticos (Fig. 6C). Em contraste, a administração de FOS e GOS aumentou a abundância de Bacterioides ($p = 0,0345$) e Parabacteroides ($p = 0,1684$) em comparação com HFD, respectivamente (Fig. 6C).

4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos do frutooligossacarídeo (FOS) e do galactooligossacarídeo (GOS) no metabolismo hepático no modelo de obesidade. Entre os numerosos mecanismos fisiopatológicos que resultam em NAFLD e outras doenças metabólicas, a associação entre disbiose da microbiota intestinal e alterações na função da barreira intestinal tem recebido atenção crescente nos últimos anos (Beisner et al., 2021; Gupta et al., 2019; Mouzaki et al., 2021; al., 2013). Os mecanismos fisiopatológicos da NAFLD resultam de respostas inflamatórias associadas à obesidade e subsequente ativação de células estreladas. Os presentes resultados demonstraram que o tratamento com FOS/GOS modulou a microbiota intestinal e atenuou a inflamação hepática e o estresse oxidativo associados à NAFLD.

O consumo crônico de HFD leva ao comprometimento do metabolismo da glicose, insensibilidade periférica à insulina e dislipidemia, cujo tratamento com FOS/GOS melhorou por meio da modulação positiva do eixo da microbiota intestinal. Da mesma forma, outros estudos mostraram que os prebióticos melhoraram a

intolerância à glicose induzida por HFD, resistência à insulina e dislipidemia (Ahmadi et al., 2019; Chunchai et al., 2018).

De acordo com Takai et al., (2020) o acúmulo de gotículas lipídicas no fígado é uma resposta adaptativa a uma anormalidade na síntese ou metabolismo lipídico. Os resultados mostraram que FOS/GOS por 42 dias diminuiu a vacuolização e os infiltrados inflamatórios e induziu uma melhor organização em todo o parênquima hepático. Outros estudos observaram resultados semelhantes; no entanto, FOS e GOS foram usados independentemente (Chappuis et al., 2017; Takai et al., 2020). Finalmente, a coloração Oil Red O foi usada para confirmar a presença e distribuição de lipídios no fígado. Finalmente, a coloração Oil Red O confirmou a presença e distribuição de lipídios no fígado. Camundongos alimentados por 18 semanas com a dieta HFD mostraram um aumento significativo no conteúdo lipídico hepático, semelhante aos resultados em outros modelos de camundongos NAFLD (Su, 2022). Em contraste, o tratamento com FOS e GOS reverteu o acúmulo hepático lipídico. Resultados semelhantes foram observados com o tratamento com α-GOS e FOS independentemente (Chappuis et al., 2017; Yao et al., 2019).

A ingestão crônica de alimentos ricos em açúcares e lipídios causa desregulação do metabolismo lipídico, excesso de ácidos graxos livres e lipogênese *de novo* nos hepatócitos (Takai et al., 2020). SREBP-1c é um fator de transcrição que regula a lipogênese ativando enzimas na biossíntese de ácidos graxos (FAs), como ACC e FAS (Su, 2022). Em nosso estudo, a HFD aumentou a imunorreatividade dos principais fatores lipogênicos SREBP-1c, FAS e ACC, consistente com outros estudos (Perfield et al., 2013). Por outro lado, o tratamento com FOS e GOS reduziu significativamente a expressão de SREBP-1c, FAS e ACC. As vias de sinalização lipogênicas continuam a ser exploradas como potenciais alvos terapêuticos (Perfield et al., 2013).

ATGL é a principal enzima no processo inicial que transforma TG em ácidos graxos livres e glicerol. A deficiência hepática de ATGL prejudica a oxidação de FA, causando esteatose hepática progressiva (Su, 2022). Chen et ai. (Yao et al., 2019) mostraram que AMPK/FOXO1/ATGL medeia a ação hipolipemiante do fenofibrato. Da mesma forma, nossos resultados mostraram que FOS e GOS aumentaram significativamente a expressão de ATGL no tecido hepático, confirmando o papel dessa via na ação hipolipemiante dos prebióticos.

Em geral, a obesidade induz inflamação hepática. A gordura visceral secreta

altos níveis de mediadores inflamatórios, como IL-6 e TNF-α, MCP-1 e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (de La Serre et al., 2010; Ley, 2021). A disbiose intestinal induzida pela dieta ocidental leva à produção reduzida de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), que são essenciais para a integridade das junções epiteliais, entre outras funções metabólicas críticas (Stolfi et al., 2022). Além disso, a liberação constante de lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de bactérias Gram-negativas induz a endotoxemia metabólica. O LPS inicia uma cascata inflamatória ativando o toll-like receptor-4 (TLR-4), que produz citocinas pró-inflamatórias e pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade e aumento da resistência à insulina. Assim, a inflamação intestinal associada aos SCFAs reduzidos pode alterar a estrutura da proteína das junções intestinais, levando ao aumento da permeabilidade intestinal de endotoxinas bacterianas e citocinas inflamatórias (de La Serre et al., 2010; Lecomte et al., 2015).

A fosforilação do NF-κB está associada à transcrição de genes pró-inflamatórios. A disbiose intestinal desempenha um papel essencial na ativação do NF-κB no fígado por meio de LPS derivado de bactérias intestinais patogênicas que se ligam ao TLR4, levando à síntese de citocinas inflamatórias (Lecomte et al., 2015). Consistente com esses achados, nossos resultados demonstraram que a HFD aumentou os níveis de pNFκB, TNF-α, IL1β e IL-6, enquanto a administração de FOS/GOS diminuiu esses efeitos. Portanto, esses resultados indicam que os efeitos protetores dos prebióticos FOS/GOS na NAFLD podem ser parcialmente atribuídos à inibição indireta da ativação do NF-κB.

A ativação da COX-2 hepática desempenha um papel importante no desenvolvimento de NAFLD e resistência à insulina (Matata e Galiñanes, 2002) e o uso de inibidores da COX-2 protege contra a inflamação hepática em modelos animais (MacSween e Burt, 1986). Como mostrado em nossos resultados, a expressão de COX-2 no fígado foi significativamente elevada em camundongos alimentados com HFD em comparação com camundongos alimentados com uma dieta padronizada, sugerindo um estado altamente inflamatório no fígado. Em contraste, FOS e GOS reduziram significativamente a expressão de COX-2.

Durante a inflamação, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) produz grandes quantidades de óxido nítrico (NO), contribuindo para a formação de nitrotirosina, um indicador de dano celular (de La Serre et al., 2010). Camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura HFD mostraram um aumento significativo na expressão

de iNOS e nitrotirosina. O aumento da expressão de iNOS estimula a ativação de NF-κB, o que pode levar à estimulação da produção de TNF-α nas células de Kupffer (Matata e Galiñanes, 2002). Assim, os níveis aumentados de iNOs observados em animais alimentados com alto teor de gordura podem estar associados ao TNF-α, conhecido por estimular a atividade da iNOS que aumenta os níveis de NO (MacSween e Burt, 1986). O presente estudo mostrou que a administração de FOS/GOS reduziu o estresse oxidativo hepático. Outros estudos relataram o efeito benéfico de prebióticos, probióticos e simbióticos no estresse oxidativo (D'Souza et al., 2010; Li et al., 2011; Rashid et al., 2020; Shahzad et al., 2022). No entanto, os mecanismos exatos pelos quais os prebióticos regulam o estresse oxidativo são desconhecidos.

A permeabilidade seletiva do epitélio intestinal é mantida por junções apertadas (TJ) que são influenciadas por vários estímulos fisiológicos e patológicos. Essas junções intercelulares são complexos multifuncionais compostos por mais de 50 proteínas, como ocludina, proteínas da família das claudinas, tricelulina e zonula occludens (ZO) (Ulluwishewa et al., 2011). Além disso, as alterações da microbiota intestinal regulam os componentes epiteliais das tight junctions (Altamirano-Barrera et al., 2018). Nosso estudo também descobriu que a intervenção dietética com FOS/GOS aumentou a expressão da proteína ocludina das tight junctions, melhorou funções de barreira intestinal e reduziu a ativação hepática da via de sinalização LPS-TLR4 (Camilleri, 2019).

A ingestão prolongada de alimentos ricos em lipídios e açúcares pode alterar a microbiota intestinal. A presente análise taxonômica da microbiota intestinal revelou que, no nível do filo, o grupo HFD aumentou os filos Firmicutes e reduziu os Bacteroidetes. Outros estudos relataram que a alta relação Firmicutes/Bacteroidetes resulta na diminuição da produção de SCFAs e pode contribuir para a progressão da NAFLD (Leung et al., 2016). Além disso, aumentar a relação F/B também aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias no intestino (Su, 2022).

Por outro lado, a presente administração de prebióticos FOS/GOS aumentou as bactérias dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria e diminuiu significativamente as do filo Firmicutes. Um estudo anterior relatou que a administração de GOS levou a uma proporção reduzida de Firmicutes/Bacteroidetes em camundongos obesos (Su, 2022). Portanto, o tratamento com FOS/GOS reverteu o aumento na relação F/B observado no grupo HFD, sugerindo que os prebióticos podem melhorar a

inflamação no fígado por meio de alterações nos micróbios intestinais. Nossos resultados em nível de gênero mostraram que a intervenção FOS/GOS aumentou significativamente Bacteroides e Parabacteroides e reduziu Desulfovibrio. Bacteroides modulam o microbioma intestinal e têm efeitos anti-inflamatórios (Tao et al., 2014; Yang et al., 2017; Zocco et al., 2007). Da mesma forma, os Parabacteroides foram positivamente correlacionados com a função anti-inflamatória, sugerindo efeitos benéficos na barreira intestinal (Johnson et al., 2017; Yao et al., 2021). Por outro lado, o Desulfovibrio tem um efeito pró-inflamatório que também pode romper a barreira intestinal (Zhang-Sun et al., 2015). Esses resultados sugerem que o tratamento com FOS/GOS modula a microbiota intestinal que pode estar por trás dos efeitos benéficos no metabolismo lipídico hepático e na via do eixo intestino-fígado, desempenhando assim um papel no tratamento da NAFLD.

5. CONCLUSÃO

A administração de prebióticos FOS e GOS modulou a composição da microbiota intestinal e fortaleceu a integridade intestinal em camundongos NAFLD induzidos por HFD. Por sua vez, a modulação da microbiota intestinal induziu a redução de marcadores inflamatórios como p-NFκB-65, IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α e IL-1β. Além disso, as alterações da microbiota por FOS e GOS atenuaram o acúmulo de gordura hepática modulando as vias lipogênica (SREBP-1c, ACC e FAS) e lipolítica (ATGL). Em conclusão, FOS e GOS podem ser usados como ferramentas nutracêuticas para prevenir e tratar NAFLD.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não houve conflito de interesse na publicação deste artigo.

Papel da fonte de financiamento

As fontes de financiamento não tiveram envolvimento no desenho do estudo; na recolha, análise e interpretação dos dados; na redação do relatório; na elaboração do artigo; nem na decisão de submeter o artigo para publicação.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Programa de Excelência em Pesquisa - Instituto Aggeu Magalhães (IAM-PROEP#400208/2019-9), ao Programa de Geração de Conhecimento da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; #VPPCB-007-FIO-18- 2-17), Instituto de Ciência e Tecnologia de Neuroimunomodulação (INCT-NIM; nº 465489/2014-1) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; nº 301777/2012-8). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) Código Financeiro 001. Todos os autores contribuíram para a elaboração do manuscrito e aprovaram sua versão final. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta de dados e análise, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

AHMADI, S. et al. Prebiotics from acorn and sago prevent high-fat-diet-induced insulin resistance via microbiome–gut–brain axis modulation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 1–13, 2019.

ALTAMIRANO-BARRERA, A. et al. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 60, p. 1–8, 2018.

BEHROUZ, V. et al. Effects of probiotic and prebiotic supplementation on metabolic parameters, liver aminotransferases, and systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 10, p. 3611–3617, 2020.

BEISNER, J. et al. Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. June, p. 1–18, 2021.

BLIESNER, A. et al. Impact of Food-Based Weight Loss Interventions on Gut Microbiome in Individuals with Obesity: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1–18, 2022.

BOMHOF, M. R. et al. Histological improvement of non-alcoholic steatohepatitis with

a prebiotic: a pilot clinical trial. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 1735–1745, 2019.

BUROKAS, A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 472–487, 2017.

CAMILLERI, M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1516–1526, 2019.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, 2018.

CHAPPUIS, E. et al. Alpha-galacto-oligosaccharides at low dose improve liver steatosis in a high-fat diet mouse model. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.

CHRISTOFF, A. P. et al. Sequencing Neoprospecta Microbiome Technologies Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **White Paper: Bacterial NGS**, n. May 2017, 2017.

CHUNCHAI, T. et al. Decreased Microglial Activation Through Gut-brain Axis by Prebiotics, Probiotics, or Synbiotics Effectively Restored Cognitive Function in Obese-insulin Resistant Rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2018.

DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. 440–448, 2010.

D'SOUZA, A. et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 67, n. 5, p. 526–531, 2010.

ESLAM, M. et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 1, p. 202–209, 2020.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55–71, 2021.

FRIEDMAN, S. L. et al. **Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies**. [s.l: s.n.]. v. 24

GILL, M. G.; MAJUMDAR, A. Metabolic associated fatty liver disease: Addressing a new era in liver transplantation. **World Journal of Hepatology**, v. 12, n. 12, p. 1168–1181, 2020.

GUPTA, H. et al. Role of gut microbiota in hepatocarcinogenesis. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.

GUPTA, H. et al. Gut Microbiome in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Mechanisms to Therapeutic Role. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 550, 2022.

Hepatology - 2021 - Barrow - Microbiota-Driven Activation of Intrahepatic B Cells Aggravates NASH Through Innate and.pdf. , [s.d.].

INOUE, Y. et al. Epidemiology of Obesity in Adults: Latest Trends. **Current obesity reports**, v. 7, n. 4, p. 276–288, 2018.

J of Gastro and Hepatol - 2017 - Wong - Asia Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017.pdf. , [s.d.].

KIMBERLY JOHNSON1, 2, JESSICA BARRAGAN1, SARAH BASHIRUDDIN1, CODY J. SMITH3, CHELSEA TYRRELL4, MICHAEL J. PARSONS5, ROSEMARIE DORIS6, SARAH KUCENAS3, GERALD B. DOWNES7, CARLA M. VELEZ1, CAITLIN SCHNEIDER1, CATALINA SAKAI1, NARENDRA PATHAK1, KATRINA ANDERS, 4; 1DEPARTMENT. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

LECOMTE, V. et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

LEUNG, C. et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 412–425, 2016.

LEY, K. **Inflammation and atherosclerosis**. **Cells**, 2021.

LI, Y. et al. Prebiotics and oxidative stress in constipated rats. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 447–452, 2011.

LIU, J. et al. Estimating Global Prevalence of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Overweight or Obese Adults. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 3, p. e573–e582, 2022.

LUSTIG, R. H. et al. Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 199, n. March, p. 115012, 2022.

MACSWEEN, R. N. M.; BURT, A. D. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 6, n. 3, p. 221–232, 1986.

MATATA, B. M.; GALIÑANES, M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-κB DNA binding activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 3, p. 2330–2335, 2002.

MOUZAKI, M. et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 120–127, 2013.

NADEAU, B. A.; CONJEEVARAM, H. The gut microbiome and nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Liver Disease**, v. 10, n. 5, p. 116–119, 2017.

PERFIELD, J. W. et al. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob Mice. **Journal of Obesity**, v. 2013, 2013.

Periodontology 2000 - 2022 - Albuquerque-Souza - Periodontitis chronic liver diseases and the emerging oral-gut-liver.pdf. , [s.d.].

RASHID, H. et al. Prebiotics supplementation ameliorates high fat high sugar diet-associated oxidative stress. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 40, n. 4, p. 467–473, 2020.

SHAHZAD, T. et al. Comparative analysis of preventive role of different probiotics and prebiotics against the markers of liver damage, oxidative stress markers and inflammatory markers in the non-alcoholic fatty liver disease induced rats. **International Journal of Food Properties**, v. 25, n. 1, p. 2514–2529, 2022.

SONG, Q.; ZHANG, X. The Role of Gut–Liver Axis in Gut Microbiome Dysbiosis Associated NAFLD and NAFLD-HCC. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2022.

STEFAN, N.; SCHICK, F.; HÄRING, H. U. Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 292–300, 2017.

STOLFI, C. et al. Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 1–27, 2022.

SU, Z. GOS Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Intestinal Microbes. 2022.

TAKAI, A. et al. Fructo-oligosaccharides ameliorate steatohepatitis, visceral adiposity, and associated chronic inflammation via increased production of short-chain fatty acids in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **BMC Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.

TAO, Y. L. et al. Cloning, expression, and characterization of the β-glucosidase hydrolyzing secoisolariciresinol diglucoside to secoisolariciresinol from Bacteroides uniformis ZL1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2519–2531, 2014.

ULLUWISHEWA, D. et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 769–776, 2011.

VELÁZQUEZ, K. T. et al. Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. **World Journal of Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 619–637, 2019.

VOS, M. B. et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nu. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 319–334, 2017.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

XIE, C.; HALEGOUA-DEMARZIO, D. Role of probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: Does gut microbiota matter? **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2019.

YANG, J. Y. et al. Gut commensal Bacteroides acidifaciens prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 104–116, 2017.

YAO, F. et al. Effect of Lactobacillus paracasei N1115 and fructooligosaccharides in nonalcoholic fatty liver disease. **Archives of Medical Science**, v. 15, n. 5, p. 1336–1344, 2019.

YAO, G. et al. Lactobacillus casei Zhang exerts probiotic effects to antibiotic-treated rats. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 5888–5897, 2021.

YOUNOSSI, Z. et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 2672–2682, 2019.

ZHANG-SUN, W. et al. Desulfovibrio desulfuricans isolates from the gut of a single individual: Structural and biological lipid A characterization. **FEBS Letters**, v. 589, n. 1, p. 165–171, 2015.

ZOCCO, M. A. et al. Bacteroides thetaiotaomicron in the gut: Molecular aspects of their interaction. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 8, p. 707–712, 2007.

Tabela 1 Efeito de FOS/GOS sobre os níveis bioquímicos em camundongos

Parâmetros	Grupos		
	Controle	HFD	HFD+FOS/GOS
Colesterol Total (mg/dL)	105,7 ± 12,09	179,9 ± 22,48$^{*\#}$	120.0 ±23,65
Triglicerídeos (mg/dL)	186.8 ± 16.21	292.3 ± 14.61$^{*\#\#}$	227.5 ± 6.61
LDL-c (mg/dL)	22.97 ± 10.75	54.01 ± 7.93$^{**\#\#}$	31.99 ± 7.17
HDL-c (mg/dL)	51.80 ± 8.31	120.2 ± 13.65*	90.75 ± 6.61
Glicose (mg/dL)	163.3 ± 10.12	217.0 ± 13.87$^{**\#\#}$	188.1 ± 12.73
Insulina (ng/mL)	0.124 ± 0.053	0.294 ± 0.084$^{**\#\#\#}$	0.188 ± 0.041

Resultados são apresentados com a média ± DP
$^{*}p < 0.0001$; $^{**}p< 0.001$ quando comparado com o grupo controle.
$^{\#}p < 0.0001$; $^{\#\#}p< 0.001$; $^{\#\#\#}p <0.05$ quando comparado com HFD+FOS/GOS.

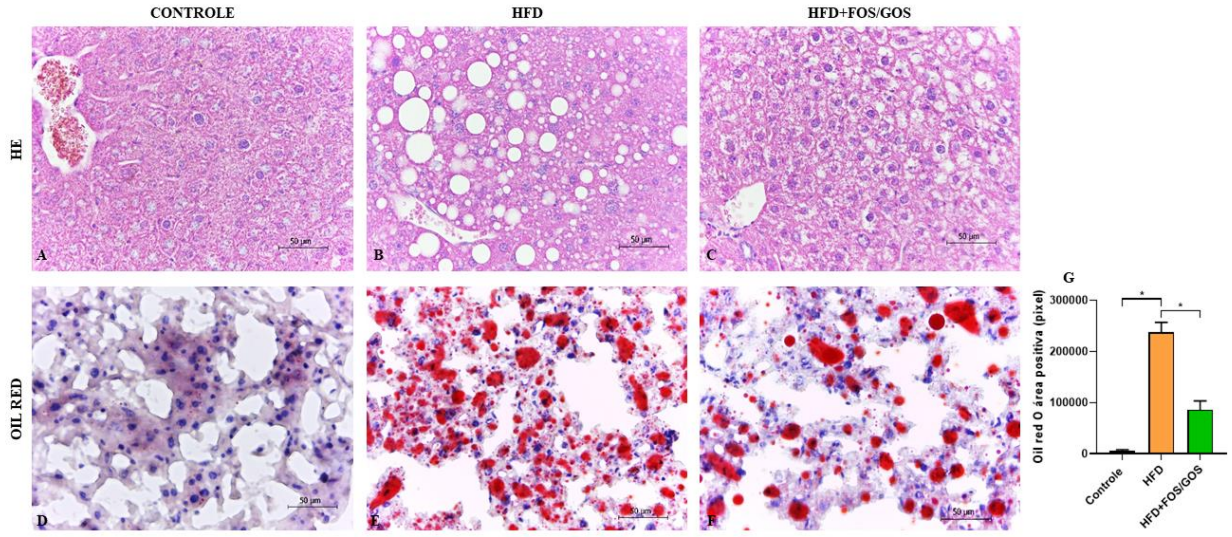


Fig 1. Efeitos dos prebióticos (FOS e GOS) nas análises histopatológicas hepáticas de camundongos C57BL/6 wild-type. Seções representativas do fígado coradas com H&E (A–C) e Oil red (D-F). (A) Grupo controle. (B) Grupo HFD exibindo esteatose macro e microvesicular. (C) Grupo prebióticos mostrando organização tecidual de arquitetura hepática normal, com redução das inclusões lipídicas nos hepatócitos. (D) Grupo controle. (E) Grupo HFD mostrando quantidade significativa de lipídios nos hepatócitos. (F) Grupo prebióticos exibindo diminuição das inclusões lipídicas. Barras 50μm. (G) Quantificação da marcação de lipídeos por Oil red (n= 5 animais). Os dados indicam diferenças significativas entre os tratamentos, *P < 0,0001 (ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

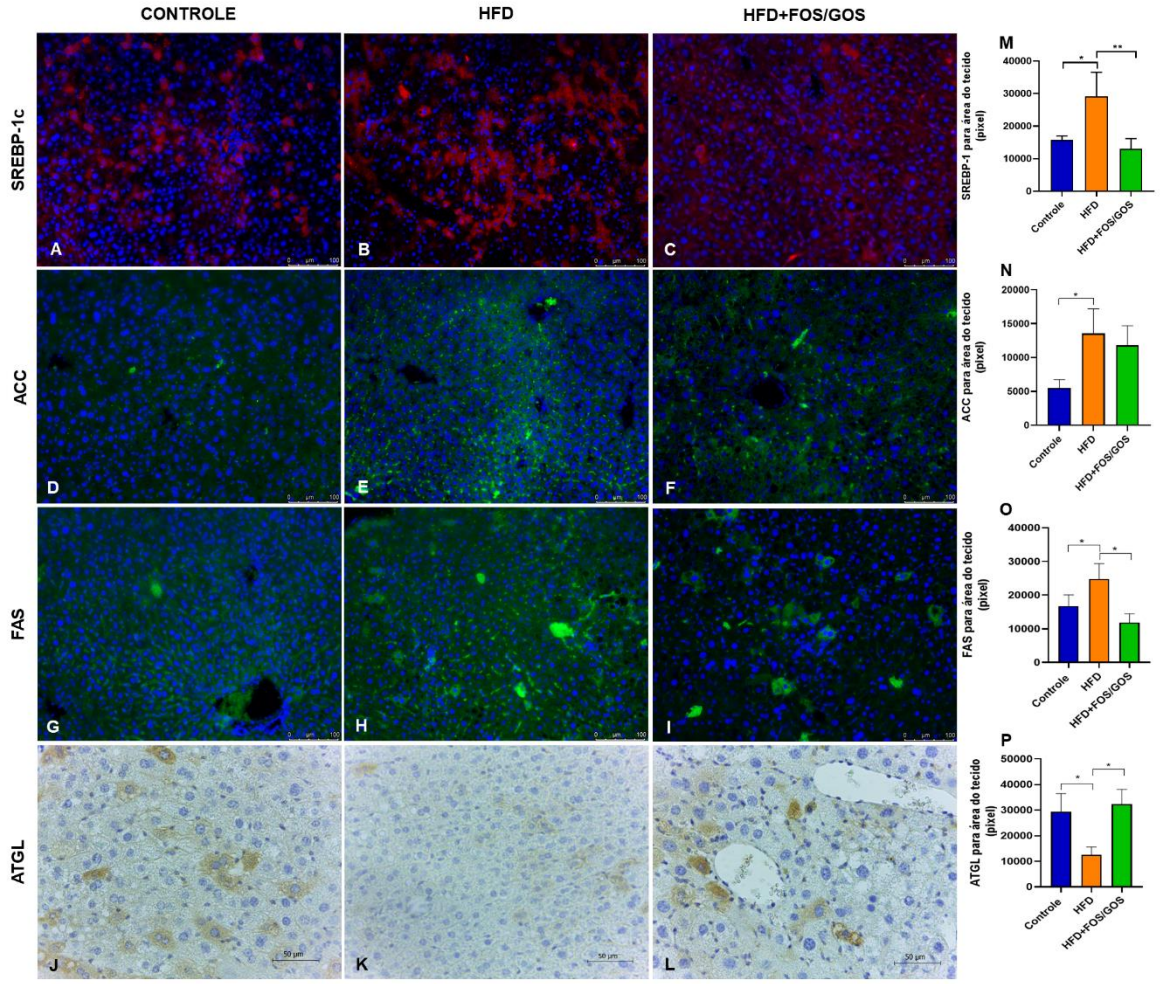


Fig. 2 Análise de imunofluorescência para proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP-1c), Acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) e análise imuno-histoquímica para lipase de triglicerídeos adiposos (ATGL) em camundongos C57BL/6 wild-type tratados com prebióticos (FOS e GOS). (A, D, G) O grupo controle exibiu baixa reatividade a SREBP-1, ACC e FAS. O grupo HFD apresentou alta reatividade (B, E, H). Por outro lado, o grupo de preobióticos exibiu reatividade reduzida para SREBP-1 e FAS, mas não reduziu a imunorreatividade de ACC em comparação com o grupo HFD. O grupo prebióticos (L) exibiu um aumento na imunorreatividade ATGL em comparação com o grupo HFD (K). Barras 50μm. (M,N,O,P) Quantificação da marcação para SREBP-1c, ACC, FAS e ATGL (n = 5). Os dados indicam diferenças significativas entre os tratamentos, *p< 0,0001, *p = 0,0010, *p< 0,0001, *p< 0,0001, respectivamente (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

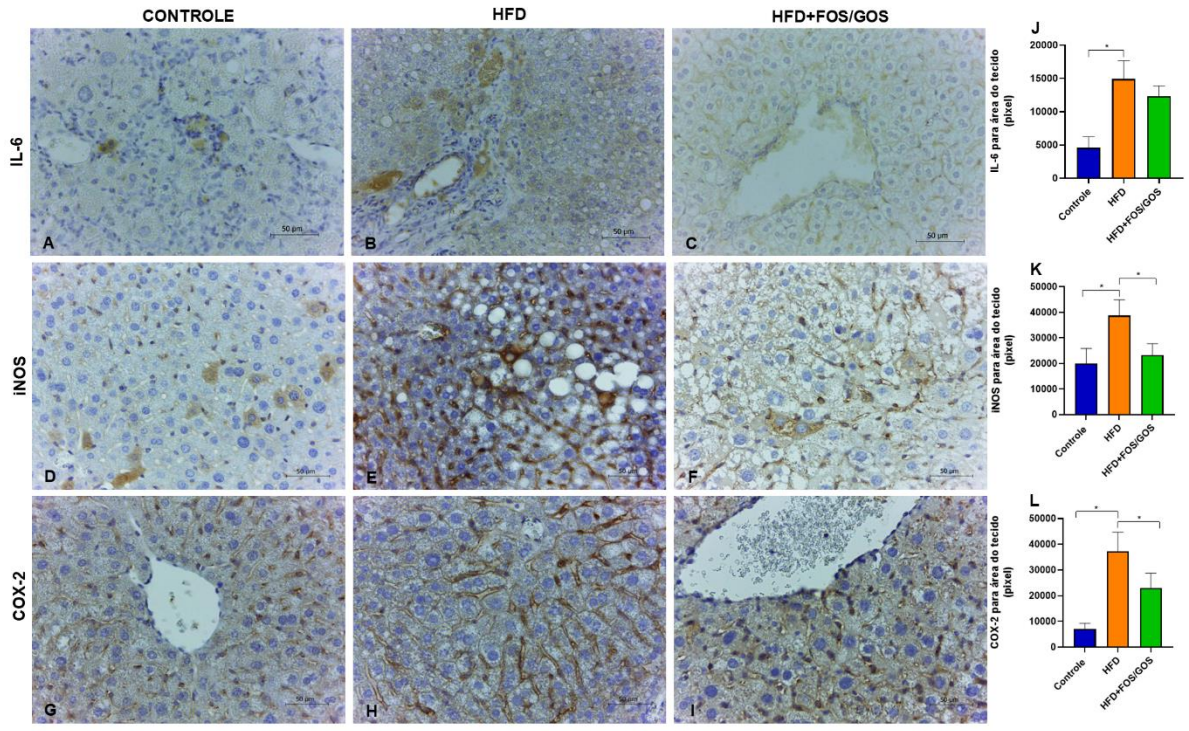


Fig 3. Análise imunohistoquímica para interleucina 6 (IL-6), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2) em camundongos C57BL/6 wild-type tratados com prebióticos (FOS e GOS). (A, D, G) O grupo controle exibiu baixa reatividade a IL-6, iNOS, COX-2. O grupo HFD apresentou alta reatividade (B, E, H). Em contraste, o grupo de preobióticos exibiu reatividade reduzida para iNOS e COX-2, mas não reduziu a imunorreatividade de IL-6 em comparação com o grupo HFD. Barras 50μm. (J,K,L) Quantificação da marcação para IL-6, iNOS, COX-2 (N = 5). Os dados denotam diferenças significativas entre os tratamentos, *p<0,0001 (ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

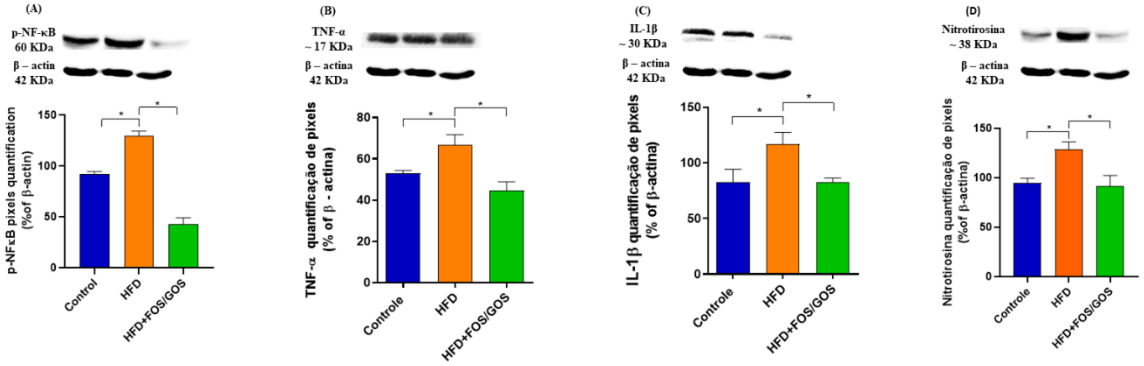


Fig 4. Análise de Western blot de moléculas relacionadas à inflamação no fígado em camundongos C57BL/6 wild-type tratados com prebióticos (FOS e GOS). Extratos proteicos foram utilizados para analisar a expressão de p-NF-κB (A), TNF-α (B), IL1-β (C) e Nitrotirosina (D). O consumo de dieta rica em gordura aumentou a expressão desses marcadores. O grupo prebiótico tratado com FOS e GOS inibiu a atividade de NF-kB e a expressão de TNF-α, IL1-β e nitrotirosina quando comparado ao grupo HFD. As colunas representam a média ± S.D. da proteína investigada. Quantificação por densidade de pixels de bandas por imageJ. Os resultados foram confirmados em três experimentos diferentes. *P <0,05 (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

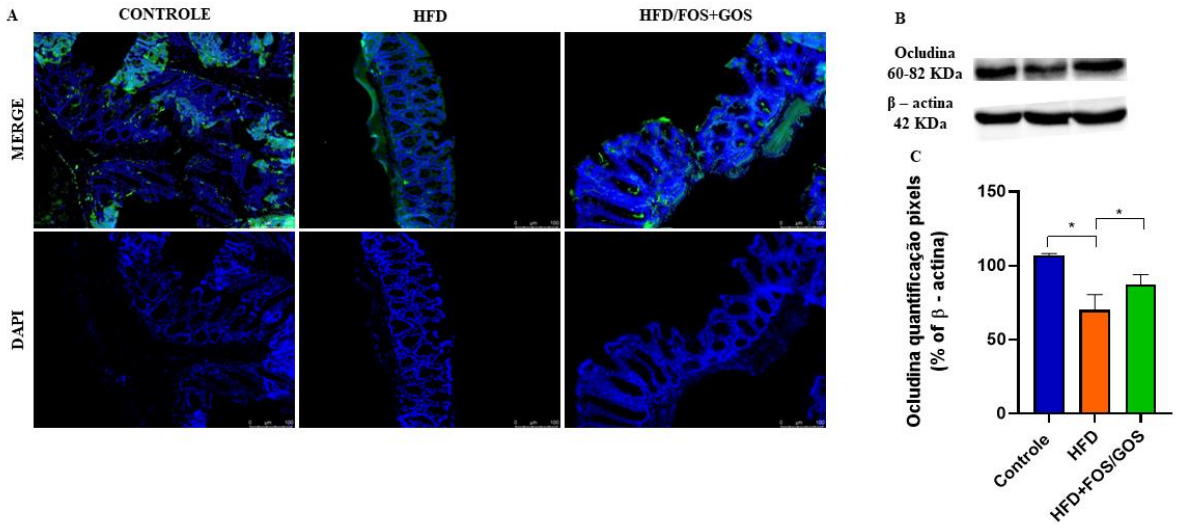


Fig. 5 Integridade intestinal em camundongos C57BL/6 wild-type tratados com prebióticos (FOS e GOS). (A) Imagens de imunofluorescência de ocludina de cólon de camundongos. Barras 100µm. (B) Imagem representativa de Western blot de ocludina em cólons de camundongos. O consumo de uma dieta rica em gordura reduziu a expressão de ocludina. O grupo tratado com FOS e GOS aumentou a expressão de ocludina quando comparado ao grupo HFD. As colunas representam a média ± S.D. da proteína investigada. Quantificação por densidade de pixels de bandas por imageJ. Os resultados foram confirmados em três experimentos diferentes. *P <0,05 (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

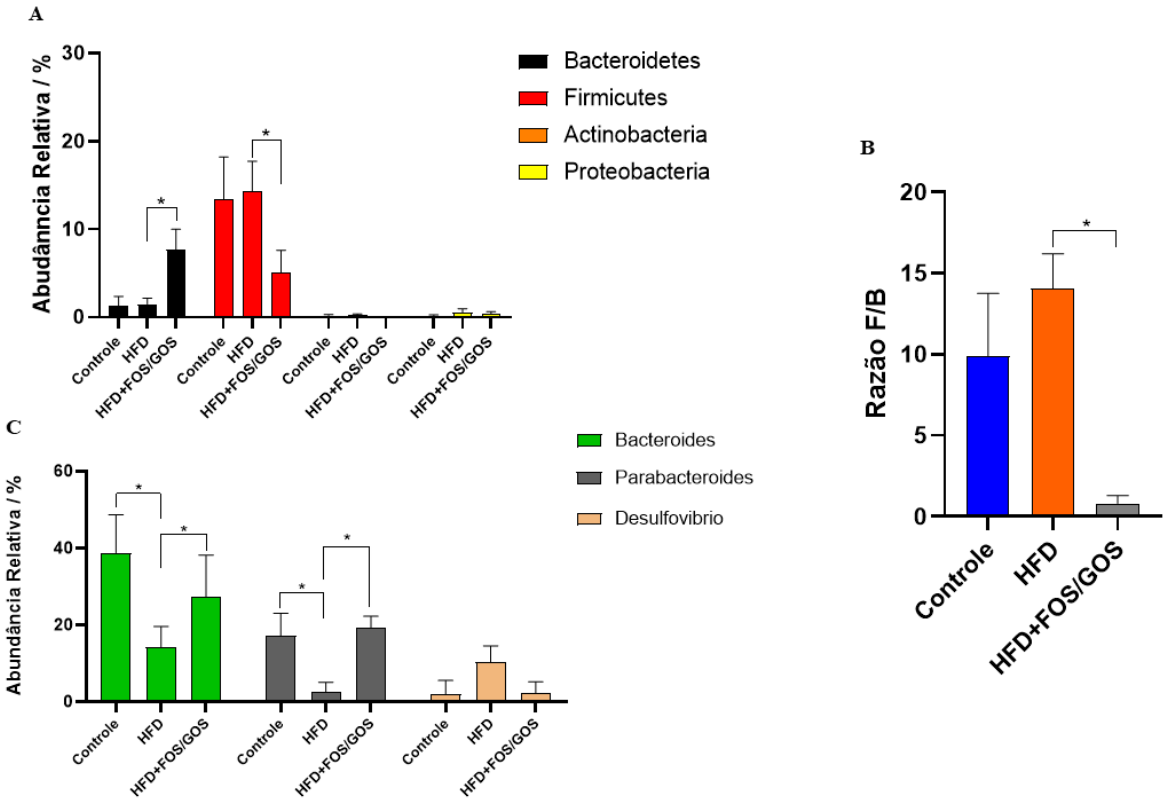


Fig. 6 Composição da microbiota intestinal modulada por FOS e GOS. (A) Comparações estatísticas de perfis bacterianos intestinais no nível do filo. (B) A razão Bacteroidetes/Firmicutes foi calculada. (C) Comparações estatísticas de perfis bacterianos intestinais em nível de gênero. Os dados representam médias ± S.D (n = 6), os resultados foram confirmados em três experimentos diferentes. *P <0,05 (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, a administração de prebióticos FOS e GOS modulou a composição da microbiota intestinal e fortaleceu a integridade intestinal em camundongos NAFLD induzidos por HFD. O tratamento induziu a redução de marcadores inflamatórios como p-NFκB-65, IL-6, iNOS, COX-2, TNF-α e IL-1β, atenuando a inflamação hepática. Os animais tratados com prebióticos apresentaram redução do acúmulo de gordura hepática através da modulação das vias lipogênica (SREBP-1c, ACC e FAS) e lipolítica (ATGL). Portanto, o FOS e GOS apresentam potencial terapêutico como ferramentas nutracêuticas para prevenir e tratar NAFLD.

6 SÚMULA CURRICULAR

- **Identificação**

Nome e profissão: Rodrigo Silva, Biomédico.
Laboratório: Laboratório de Ultraestrutura – IAM / FIOCRUZ – PE

- **Produção Científica**

Artigo 1. Mendonça, Ingrid Prata ; Paiva, Igor Henrique Rodrigues de ; Duarte-Silva, Eduardo Pereira ; Melo, Michel Gomes de ; **Silva, Rodrigo Soares da** ; Oliveira, Wilma Helena de ; Costa, Belmira Lara da Silveira Andrade da; Peixoto, Christina Alves. Metformin and Fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation, neurogenesis and neuroplasticity. INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, v. 102, p. 108415, 2022. Link: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108415

Artigo 2. Mendonça, Ingrid Prata ; de Paiva, Igor Henrique Rodrigues ; Duarte-Silva, Eduardo Pereira ; de Melo, Michel Gomes ; **da Silva, Rodrigo S.**; do Nascimento, Maria Isabelly Xavier ; Peixoto, Christina Alves. Metformin improves depressive-like behavior in experimental Parkinson's disease by inducing autophagy in the substantia nigra and hippocampus. INFLAMMOPHARMACOLOGY, v. 30, p. 1705-1716, 2022. Link: DOI: 10.1007/s10787-022-01043-6

Artigo 3. **Rodrigo Soares da Silva**; Ingrid Prata Mendonça; Igor Henrique Rodrigues de Paiva; José Roberto Botelho de Souza; Christina Alves Peixoto. Prebiotics Reduce Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Modulating Gut Microbiota in Obese Mice. Artigo submetido para revista Food and Chemical Toxicology. Impact Factor: 5.572.

- **Participação em eventos, congressos, exposições e feiras**

I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável.
Semana de Pesquisa e Extensão – SEMPEX FITS, na qualidade de AVALIADOR de trabalhos de pesquisa apresentados na modalidade oral e banner.

- **Prêmios**

O Trabalho ‘Efeitos dos prebióticos Fruto-oligossacarídeos [FOS] e Galactooligossacarídeos [GOS] sobre a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD)’ de autoria de Rodrigo Soares da Silva foi premiado na Categoria Mestrado durante o evento ‘‘I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável’’, promovido pelo Diretoria do(a) Centro de Biociências.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 11, p. 1450–1459, 2015.

ALBILLOS, A.; DE GOTTARDI, A.; RESCIGNO, M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. **Journal of Hepatology**, v. 72, n. 3, p. 558–577, 2020.

ANG, Z.; DING, J. L. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation - Protective or causative? **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. FEB, p. 1–5, 2016.

ARJMANDI, B. H. et al. Addition of fructooligosaccharides and dried plum to soy-based diets reverses bone loss in the ovariectomized rat. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

AZIMIRAD, M. et al. The effects of feeding with synbiotic (Pediococcus acidilactici and fructooligosaccharide) enriched adult Artemia on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (Pterophyllum scalare). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 516–522, 2016.

BEN Z. STANGER. Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver Ben. **Annual Review of Physiology**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2015.

BINDELS, L. B. et al. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 8, p. 1337–1344, 2012.

BOGDANOS, D. P.; GAO, B.; GERSHWIN, M. E. Liver Immunology Dimitrios. **Comperative Physiology**, v. 3, n. 2, p. 567–598, 2013.

BRANDT, A. et al. Short-term intake of a fructose-, fat- and cholesterol-rich diet causes hepatic steatosis in mice: Effect of antibiotic treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 2017.

BROWNING, J. D. et al. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury Find the latest version : Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2004.

BRUN, P. et al. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 2, p. 518–525, 2007.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: A multisystem disease. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. S1, p. S47–S64, 2015.

CANI, P. D. et al. Resistance. v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CAZANAVE, S. C.; SANYAL, A. J. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatic De Novo Lipogenesis and Regulation of Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 101–129, 2015.

CHEN, G. et al. Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. **EBioMedicine**, v. 30, p. 317–325, 2018.

CHEN, J.; VITETTA, L. Gut microbiota metabolites in nafld pathogenesis and therapeutic implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–19, 2020.

CHEUNG, O.; SANYAL, A. J. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 28, n. 4, p. 351–359, 2008.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A.; BELLENTANI, S. Nutraceutical approach to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): The available clinical evidence. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 2018.

CLAṘIA, J. Natural killer cell recognition and killing of activated hepatic stellate cells. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 792–793, 2012.

COMPARE, D. et al. Gut-liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 22, n. 6, p. 471–476, 2012.

COSTA, G. T.; GUIMARÃES, S. B.; SAMPAIO, H. A. C. Fructo-oligosaccharide effects on blood glucose. An overview [Efeitos dos fruto-oligossacar{í}deos no controle glic{ê}mico. revis{ã}o]. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 279–282, 2012.

DAUBIOUL, C. A. et al. Effects of oligofructose on glucose and lipid metabolism in patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 723–726, 2005.

DE CREUS, A. et al. Low TLR4 Expression by Liver Dendritic Cells Correlates with Reduced Capacity to Activate Allogeneic T Cells in Response to Endotoxin. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 2037–2045, 2005.

DI BARTOLOMEO, F.; VAN DEN ENDE, W. Fructose and Fructans: Opposite Effects

on Health? **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 227–237, 2015.

DORN, C. et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 5, p. 505–514, 2010.

DWIVEDI, M. et al. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 4, p. 379–392, 2016.

EL-ZAYADI, A. R. Hepatic steatosis: A benign disease or a silent killer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 26, p. 4120–4126, 2008.

EVERARD, A. et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2775–2786, 2011.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273–2282, 2004.

FANARO, S. et al. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement**, v. 94, n. 449, p. 22–26, 2005.

FARR, S. et al. Central nervous system regulation of intestinal lipoprotein metabolism by glucagon-like peptide-1 via a Brain-Gut Axis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 5, p. 1092–1100, 2015.

FEROLLA, S. M. et al. The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5583–5599, 2014.

FEROLLA, S. M. et al. Probiotics as a complementary therapeutic approach in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 559–565, 2015.

FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. SUPPL. 2, p. 83–92, 2010.

FEWTRELL, M. S. et al. Optimal duration of exclusive breastfeeding: What is the evidence to support current recommendations? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 635–638, 2007.

FUKUI, H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? **Inflammatory Intestinal Diseases**, v. 1, n. 3, p. 135–145, 2016.

GAGGINI, M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1544–1560, 2013.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259–275, 2004.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

GU, J. et al. Fructooligosaccharides (FOS) significantly increased the relative abundance of intestinal B. pseudolongum in mice with different genotypes. **Current Research in Food Science**, v. 5, n. October, p. 2178–2189, 2022.

HE, N. et al. Enzymatically synthesized a-galactooligosaccharides attenuate metabolic syndrome in high-fat diet induced mice in association with the modulation of gut microbiota. **Food and Function**, v. 12, n. 11, p. 4960–4971, 2021.

Hepatology - 2010 - Neuschwander-Tetri - Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis The.pdf. , [s.d.].

Hepatology - 2016 - Younossi - Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease Meta%E2%80%90analytic assessment of. , [s.d.].

HIDEAKI, T. et al. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. v. 30, n. 3, p. 149–156, 2009.

HRNCIR, T. et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 957, 2021.

HUANG, S. et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 2002–2013, 2012.

ISHIOKA, M. et al. Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 2, p. 396–406, 2017.

J of Gastro and Hepatol - 2017 - Wilson - Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides definition .pdf. , [s.d.].

KAREB, O.; AÏDER, M. Whey and Its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: a Critical Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 348–369, 2019.

KARNIKOWSKI, M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 125, n. 6, p.

333–337, 2007.

KARUNARATNE, T. B. et al. Niacin and butyrate: Nutraceuticals targeting dysbiosis and intestinal permeability in parkinson's disease. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2021.

KNUDSEN, K. E. B. et al. Impact of diet-modulated butyrate production on intestinal barrier function and inflammation. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 2018.

KOEK, G. H.; LIEDORP, P. R.; BAST, A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 15–16, p. 1297–1305, 2011.

KOH, A. et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016.

KOK, N.; ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 45, n. 12, p. 1547–1550, 1996.

KOLODZIEJCZYK, A. A. et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH . **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2019.

LACERDA, D. DOS S.; BOCK, P. M.; FUNCHAL, C. Consumo exacerbado de lipídeos provoca dano celular em algumas doenças metabólicas e cardiovasculares. **Nutrire**, v. 40, n. 2, p. 200–213, 2015.

LE ROY, T. et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1787–1794, 2013.

LEUNG, C. et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 412–425, 2016.

LIMA, G. C. Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e no pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento. 2011.

LIMA, M. et al. Perfil Clínico-Epidemiológico Das Doenças Gastroenterologia Do Unifeso Clinical and Epidemiological Profile of Chronic Liver Diseases. **Revista Caderno de Medicina**, v. 1, p. 142–156, 2018.

LIU, J. P. et al. Effects of different diets on intestinal microbiota and nonalcoholic fatty liver disease development. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 32, p. 7353–7364, 2016a.

LIU, T. et al. Nondigestible Fructans Alter Gastrointestinal Barrier Function , Gene Expression , Histomorphology , and the Microbiota Profiles of Diet-Induced Obese C57BL / 6J Mice 1 – 3. 2016b.

LOBO, A. R. et al. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats:

The effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 8, p. 1286–1295, 2014.

LOOMBA, R. et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1054- 1062.e5, 2017.

LU, Y. et al. Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating g protein-coupled receptors and gut Microbiota. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–13, 2016.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MACEDO, L. L.; VIMERCATI, W. C.; ARAÚJO, C. DA S. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. 1–9, 2020.

MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: A dangerous quartet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 1–20, 2016.

MASUOKA, H. C.; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 106–122, 2013.

MEI, Z.; YUAN, J.; LI, D. Biological activity of galacto-oligosaccharides: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. September, p. 1–7, 2022.

MISTRY, R. H. et al. Long-Term β-galacto-oligosaccharides Supplementation Decreases the Development of Obesity and Insulin Resistance in Mice Fed a Western-Type Diet. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 64, n. 12, p. 1–11, 2020.

Molecular Nutrition Food Res - 2020 - Mistry - Long-Term -galacto-oligosaccharides Supplementation Decreases the.pdf. , [s.d.].

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 1–26, 2009.

NALBANTOGLU, I.; BRUNT, E. M. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 27, p. 9026–9037, 2014.

NI, Y. et al. The Role of Gut Microbiota-Bile Acids Axis in the Progression of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. June, 2022.

PACHIKIAN, B. D. et al. Prebiotic approach alleviates hepatic steatosis: Implication of fatty acid oxidative and cholesterol synthesis pathways. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 2, p. 347–359, 2013.

PADOIN, A. V. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of cirrhosis. **Scientia Medica**, v. 18, n. 4, p. 172–176, 2008.

PARENTE, D. B. Imaging methods in the assessment of nonalcoholic fatty liver disease TT - Métodos de imagem na avaliação da doença hepática gordurosa não alcoólica. **Radiol. bras**, v. 53, n. 2, p. IX–X, 2020.

PARKER, R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. **Liver Research**, v. 2, n. 1, p. 35–42, 2018.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385–390, 2003.

PÉREZ-REYTOR, D. et al. Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. May, p. 1–8, 2021.

PIAZZOLLA, V. A.; MANGIA, A. Noninvasive diagnosis of NAFLD and NASH. **Cells**, v. 9, n. 4, 2020.

POKUSAEVA, K.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 285–306, 2011.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. **Minerva Endocrinologica**, v. 42, n. 2, p. 92–108, 2017.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics**. [s.l.] Elsevier Inc, 2019. v. 92

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 22, p. 2263–2273, 2015.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, 2007.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. SUPPL.2, 2010.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de**

Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SABATER-MOLINA, M. et al. Dietary fructooligosaccharides. **Journal of Physiology & Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 315–328, 2009.

SAFARI, Z.; GÉRARD, P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 8, p. 1541–1558, 2019.

SALTZMAN, E. T. et al. Intestinal microbiome shifts, dysbiosis, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–11, 2018.

SCHOELER, M.; CAESAR, R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 20, n. 4, p. 461–472, 2019.

SHANAB, A. A. et al. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: Association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 5, p. 1524–1534, 2011.

SHEN, F. et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 4, p. 375–381, 2017.

SINGH, N. et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 128–139, 2014.

SIVANAND. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010.

SPRADLEY, F. T. et al. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease as a risk factor for exaggerated metabolic and cardiovascular-renal disease. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 5, p. E795–E814, 2018.

STANTON, M. C. et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. **Journal of Inflammation**, v. 8, p. 1–14, 2011.

SUGATANI, J. et al. Dietary inulin alleviates hepatic steatosis and xenobiotics-induced liver injury in rats fed a high-fat and high-sucrose diet: Association with the

suppression of hepatic cytochrome P450 and hepatocyte nuclear factor 4α expression. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 10, p. 1677–1687, 2006.

SUN, L. et al. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. **Protein and Cell**, v. 9, n. 5, p. 397–403, 2018.

TACKE, F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, n. S1, p. S27, 2012.

TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1–20, 2017.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.

TIAN, S. et al. Changes in ileal microbial composition and microbial metabolism by an early-life galacto-oligosaccharides intervention in a neonatal porcine model. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.

TILG, H.; CANI, P. D.; MAYER, E. A. Gut microbiome and liver diseases. **Gut**, v. 65, n. 12, p. 2035–2044, 2016.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2017.

VULEVIC, J. et al. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1438–1446, 2008.

WANG, J. et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, p. 1–19, 2020.

WANG, L. et al. Effects of different oligosaccharides at various dosages on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation. **Food and Function**, v. 8, n. 5, p. 1966–1978, 2017.

WEIJERS, C. A. G. M.; FRANSSEN, M. C. R.; VISSER, G. M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 436–456, 2008.

WEISS, J.; RAU, M.; GEIER, A. Nichtalkoholische fettlebererkrankung: Epidemiologie, verlauf, diagnostik und therapie. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 111, n. 26, p. 447–452, 2014.

XUEFENG CHEN, ET AL, 2011; REITER, P. L.; MCREE, A.-L. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2011.

YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11–20, 2018.

YOUNOSSI, Z. M. et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, n. September 2022, p. 1–13, 2023.

ZHANG, X. et al. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 164–177, 2018.

ZHENG, J. et al. Chitosan oligosaccharides improve the disturbance in glucose metabolism and reverse the dysbiosis of gut microbiota in diabetic mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. 1, p. 77–86, 2018.

ZHOU, X. et al. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2014.

ANEXO – Certificado CEUA/IAM 135/2018

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)

Letter of IACUC Approval

We certify that the project entitled **"AÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A FLUOXETINA SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO, COGNIÇÃO E DEPRESSÃO EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE"** (IACUC protocol number nº **135/2018**), coordinated by **Christina Alves Peixoto** follows strictly the ethical principles in animal research and is in accordance with the Brazilian federal law 11.794/2008. The project was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation and is valid until february 2022. It is the responsibility of the Principal Investigator to notify the IACUC of any proposed changes regarding the work described within this project. The Principal Investigator agrees that no such changes will be implemented until approved by the IACUC/IAM.

Number of animals approved	
Species/Strain/Breed	**Number of animals/Weight/Age/Sex**
Inbred Mouse C57BL6 LDL r-/-	150 (20 gr/ 8-10 weeks / females)
Total	**150**

Recife (PE, Brazil), February, 06, 2019

Mª Edileuza Felinto de Brito
IACUC Vice Chair/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE
Mat. Siape 0464741
E-mail: britomef@cpqam.fiocruz.br