



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica – PPGNAFPF**

CARLA MIRELE TABÓSA QUIXABEIRA

**Efeitos da β -glucana obtida do kefir na insuficiência hepática aguda induzida por
acetaminofeno em camundongos**

**Vitória de Santo Antão/PE
2020**



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica – PPGNAFPF**

Carla Mirele Tabósa Quixabeira

**Efeitos da β -glucana obtida do kefir na insuficiência hepática aguda induzida por
acetaminofeno em camundongos**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bases experimentais

Orientador: Eduardo Carvalho Lira

Co-orientador: Mariana Pinheiro Fernandes

Vitória de Santo Antão/PE

2020

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4/2005

- Q8 Quixabeira, Carla Mirele Tabósa
Efeitos da β -glucana obtida do kefir na insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos. / Carla Mirele Tabósa Quixabeira. - Vitória de Santo Antão, 2020.
112 folhas; il., fig., tab.
- Orientador: Eduardo Carvalho Lira.
Coorientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2020.
Inclui referências, anexos e apêndices.
1. Falência Hepática Aguda. 2. Estresse oxidativo. 3. Kefir. I. Lira, Eduardo Carvalho (Orientador). II. Fernandes, Mariana Pinheiro (Coorientadora). III. Título.

616.362 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-015/2020

CARLA MIRELE TABÓSA QUIXABEIRA

**EFEITOS DA β -GLUCANA OBTIDA DO KEFIR NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA
AGUDA INDUZIDA POR ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Aprovada em: 05/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Yara (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico a todos que de alguma forma
contribuíram para que este
trabalho fosse concluído.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco -UFPE pela oportunidade do curso oferecido, a CAPES pela bolsa concedida no início do Mestrado, a minha família pelo apoio e a todos do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo coordenado pelo professor Eduardo Carvalliho Lira e professora Dayane pela acolhida. Agradeço também a todos da turma 2018.1 do CAV, fomos todos sobreviventes nessa jornada. E aos componentes da banca por todas as colaborações e incentivo à continuidade da pesquisa.

Pequenas águias correm risco quando voam

Mas devem arriscar

Só que é preciso olhar os pais como eles voam

E aperfeiçoar

Haja mau tempo haja correntes traiçoeiras

Se já tem asas seu destino é voar

Tem que sair e regressar ao mesmo ninho

E outro dia, outra vez recomeçar

(Águia pequena: Padre Zezinho)

RESUMO

O acetaminofeno (APAP, paracetamol) é um dos analgésicos e antipiréticos mais utilizados no mundo. Ainda que terapeuticamente seguro, o uso abusivo e, normalmente não prescrito, pode ocasionar insuficiência hepática aguda (IHA), o que o torna uma grande preocupação na prática clínica. A metabolização de doses excessivas de APAP produz o N-acetyl-p-benzoquinona-imina (NAPQI) e depleção rápida da glutathiona (GSH), provocando intenso estresse oxidativo, principal mecanismo envolvido ao desenvolvimento da necrose centrobular e IHA. O uso da n-acetilcisteína (NAC) é a única opção de tratamento da IHA induzida pelo APAP, mas, que tem seu uso limitado pelos efeitos adversos. Neste sentido, a busca por novos agentes terapêuticos se tornou uma necessidade para a prevenção e/ou tratamento da IHA. Intensificou-se o estudo de moléculas que possam atenuar o estresse oxidativo resultantes do metabolismo do APAP, entre os quais estão os exopolissacarídeos obtidos dos grãos de kefir. Estudos tem mostrado a utilização do kefir como agente antioxidante. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da β -glucana (BG) derivada do kefir na IHA induzida pelo APAP em camundongos. Camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss (30-40g) receberam BG ou salina 0,9%. Posteriormente, todos os animais, exceto o grupo controle (C), receberam uma dose única de APAP (250mg/kg, i.p.). 24 horas após a intoxicação por APAP, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e tecido para quantificação de marcadores de dano hepático. O APAP provocou insuficiência hepática aguda verificada através do aumento dos níveis dos indicadores avaliados, assim como provocou alterações histopatológica compatíveis à necrose centrolobular. A BG apresentou efeitos positivos sobre esses parâmetros.

Palavras-chave: Acetaminofeno. Insuficiência hepática aguda. Estresse oxidativo. Kefir.

ABSTRACT

Acetaminophen (APAP, paracetamol) is one of the most widely used analgesics and antipyretics in the world. Although therapeutically safe, abusive and usually not prescribed use can cause acute liver failure (ALF), which makes it a major concern in clinical practice. The metabolization of excessive doses of APAP produces N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) and rapid glutathione depletion (GSH), causing intense oxidative stress, the main mechanism involved in the development of centrobular necrosis and ALF. The use of n-acetylcysteine (NAC) is the only treatment option for APAP-induced ALF, but its use is limited by adverse effects. In this sense, the search for new therapeutic agents has become a necessity for the prevention and/or treatment of ALF. The study of molecules that can attenuate oxidative stress resulting from APAP metabolism was intensified, among which are exopolysaccharides obtained from kefir grains. Studies have shown the use of kefir as an antioxidant agent. The aim of this study was to evaluate the effect of β -glucan (BG) derived from kefir in APAP-induced ALF in mice. Male mice (*Mus musculus*) of the Swiss strain (30-40g) received BG or saline 0.9%. Subsequently, all animals, except the control group (C), received a single dose of APAP (250mg/kg, i.p.). 24 hours after APAP poisoning, the animals were anesthetized to collect blood and tissue to quantify markers of liver damage. APAP caused acute liver failure by increasing the levels of the evaluated indicators, as well as caused histopathological changes compatible with centrolobular necrosis. BG had positive effects on these parameters.

Keywords: Acetaminophen. Acute liver failure. Oxidative stress. Kefir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização anatômica do fígado. Relações anatômicas do fígado com a vesícula biliar, estômago, duodeno e pâncreas.....	18
Figura 2 - Citoarquitetura do fígado. B: Estrutura geral do lóbulo hepático; C: Relação entre os compartimentos celulares.....	19
Figura 3 – Micrografia de lóbulo hepático humano saudável. Coloração hematoxilina e eosina. Objetiva 40X.	20
Figura 4 – Zonas de metabolismo do fígado. A zona periportal recebe uma maior irrigação de sangue e oxigênio comparada a perivenosa. Quanto maior o aporte de oxigênio, mais elevado o metabolismo oxidativo.	20
Figura 5 - Fibrose na lesão hepática aguda versus crônica. A lesão aguda é caracterizada por inflamação, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (MEC) associado com proliferação de hepatócitos.....	23
Figura 6 - Metabolismo do acetaminofeno: a via preferencial de metabolização é na fase II onde ocorre a glicoronidação e sulfatação.....	26
Figura 7 - Estrutura molecular da β -glucana.	28
Figura 8 - Desenho experimental para avaliação do efeito hepatoprotetor da β -glucana extraída do kefir em modelo de insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP) em camundongos APAP: acetaminofeno; v.o: via oral; i.p: intraperitoneal.....	33
Figura 9 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β - glucana extraída do kefir na massa corporal total em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).....	39
Figura 10- Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT,A) e aspartato (AST, B) aminotransferases em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP).....	40
Figura 11 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de glutathiona (GSH) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).	42
Figura 12 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em	

camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).	43
Figura 13 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de nitrito em camundongos com insuficiência hepática induzida pelo acetaminofeno (APAP)......	44
Figura 14 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD, A) e catalase (CAT, B) no fígado de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).	45
Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com β -glucana do kefir na morfologia hepática de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP).	46
Figura 16 – Esquema resumo dos resultados do estudo: Efeitos do pré-tratamento com a β -glucana obtida do kefir sobre a insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de proteínas totais (PTN) e albumina (ALB) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB – albumina;

ALT - alanina aminotransferase;

ANOVA - *analysis of variance*

AST - aspartato aminotransferase;

ATP – adenosina trifosfato;

APAP – Acetaminofeno;

BG – β -glucana;

BGH – β -glucana hidrolisada

BGI – β -glucana íntegra

CAT – catalase;

CTRL - controle

CYP – citocromo P450

DMSO – dimetilsulfóxido;

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético;

EP - erro padrão

EPS – exopolissacarídeos;

EROS – espécies reativas de oxigênio;

EUA – Estados Unidos da América

GH – Hormônio do crescimento;

GSH - glutationa reduzida;

i.p. – intraperitoneal;

IHA – insuficiência hepática aguda;

kg – quilograma;

LHC – lesão hepática crônica;

LHIM – lesão hepática induzida por medicamentos;

LNEM – Laboratório de neuroendocrinologia e metabolismo;

LPO: peroxidação lipídica;

MDA – malondialdeído;

MEC - matriz extracelular;

mg- miligrama;

MMPs – metaloproteinases;

NAC - N-acetilcisteína;

NaNO₂ – Nitrito de sódio;

NAPQI - N-acetyl-p-benzoquinona imina;

NK – *Natural killer*;

OPT – oftaldialdeído;

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil;

PTN: proteínas totais

RPM – rotações por minuto

SIL – Silimarina;

SOD - superóxido dismutase;

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

UGT - UDP glicosiltransferase;

v.o. – via oral;

µl – microlitro.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Fisiologia hepática	18
2.2 Estresse oxidativo	21
2.3 Tipos de Lesões hepáticas	23
2.4 Acetaminofeno (APAP): metabolismo hepático e toxicidade	25
2.5 Utilização do kefir na medicina alternativa	27
2.6 β-glucana (BG)	27
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo Geral	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 Obtenção da β-glucana do kefir	32
5.2 Modelo Experimental de Insuficiência Hepática Aguda (IHA) induzida por Acetaminofeno (APAP).	32
5.2.1 Animais	32
5.2.2 Desenho experimental	32
5.2.2.1 Formação dos grupos	32
5.2.2.2 Diluição da β-glucana íntegra (BGI)	33
5.2.2.3 Diluição da β – glucana hidrolisada (BGH)	34
5.2.2.4 Diluição da silimarina	34
5.2.2.5 Diluição do acetaminofeno	34
5.2.3 Eutanásia	34
5.2.4 Análise do perfil bioquímico	35
5.2.5 Massa corporal	36
5.2.6 Análise dos marcadores de estresse oxidativo	36
5.2.6.1 Determinação da Concentração de malonaldeído (MDA)	36

5.2.6.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	36
5.2.6.3 Determinação da Atividade da Catalase	37
5.2.6.4 Níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	37
5.2.6.5 Determinação dos níveis de nitrito	37
5.3 Análise histopatológica.....	38
5.4 Análise Estatística.....	38
6 RESULTADOS	39
6.1 Efeito da β-glucana (BG) extraída do kefir na lesão hepática aguda induzida por acetaminogeno (APAP) em camundondos	39
6.2 Efeito da β-glucana do kefir nos marcadores de estresse oxidativo.....	41
7 DISCUSSÃO	47
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
9 PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL	66
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	98
ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO.....	99

1 APRESENTAÇÃO

A lesão hepática induzida por medicamentos (LHIM) é a causa mais comum da insuficiência hepática aguda (IHA) e uma das grandes preocupações na prática clínica, sobretudo pelo uso não prescrito e/ou abusivo de diferentes fármacos (HELAL; SAMRA, 2020). Além disso, avaliar os efeitos hepatotóxicos a partir de modelos de LHIM *in vitro* e *in vivo* é uma etapa determinante no desenvolvimento de novos fármacos e criteriosamente monitorado por agências governamentais de controle em diferentes países, inclusive o Brasil (KUEHN, 2009; KUNA *et al.*, 2018).

Reconhecer a etiologia da LHIM é clinicamente difícil, porém fundamental para o manejo adequado, prevenindo a IHA e subsequente necessidade de transplante (STINE; LEWIS, 2016). De acordo com dados registrados entre 1998 e 2019 pelo Grupo de Estudos para Insuficiência Hepática Aguda de Adultos nos EUA, o uso abusivo do acetaminofeno (APAP, N-acetil-p-aminophenol), popularmente conhecido como paracetamol, corresponde a aproximadamente 50% dos casos (STRAVITZ; LEE, 2019). No Brasil, a segunda causa de insuficiência hepática aguda é lesão hepática induzida por medicamentos (MELO; MAIA; MEIRELLES, 2017), não sendo clara a prevalência do número de casos associados somente ao acetaminofeno.

O APAP é um dos analgésicos e antipiréticos mais utilizados no mundo, sobretudo por não necessitar de prescrição médica para aquisição em farmácias (JOZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014). Embora seja considerado seguro do ponto de vista terapêutico, bem tolerado por adultos e crianças, o uso abusivo, intencional ou não, está diretamente associado a intoxicações hepáticas principalmente pelo intenso estresse oxidativo e necrose centrolobular que induzem a IHA, o que pode causar o óbito (LEE, 2012).

Visto que a IHA induzida pelo APAP está, historicamente, associada a tentativas de suicídio, principalmente na década de 1980, o uso abusivo desse fármaco tem recebido atenção nos países desenvolvidos como EUA e Reino Unido, onde estratégias, como a redução na quantidade de comprimidos por cartela, foram criadas no intuito de amenizar indiretamente a superdosagem intencional, ou não (GUNNELL *et al.*, 2013). Além disso, há uma crescente preocupação devido ao uso conjunto de formulações farmacêuticas diversas que trazem em sua composição o APAP e são amplamente utilizadas pela população (SHIFFMAN *et al.*, 2018).

No Brasil, essa preocupação assume caráter ainda mais sério, sobretudo pela emergência das arboviroses como dengue, zika e chikungunya, cuja medicação de escolha para tratamento dos principais sintomas em fase aguda como dor e febre é o paracetamol (MALAVIGE; FERNANDO; FERNANDO, 2004).

A N-acetilcisteína (NAC) é a alternativa terapêutica preconizada clinicamente para o tratamento da IHA induzida pelo APAP por melhorar as defesas antioxidantes hepáticas (HEARD, 2008). Entretanto, o uso clínico da NAC é limitado pela estreita janela terapêutica e os efeitos adversos tais como reações anafiláticas, angioedema, cefaleia, diarreia, náusea, vômitos e pruridos (HEARD, 2008; SANDILANDS; BATEMAN, 2009; YAREMA *et al.*, 2018). Por esse motivo, a busca por novas alternativas seguras é essencial na prevenção e/ou tratamento da hepatotoxicidade aguda induzida pelo acetaminofeno. Neste sentido, produtos de origem natural, como extrato de plantas e probióticos, são alternativas promissoras na busca por novos recursos terapêuticos para o tratamento desse tipo de intoxicação.

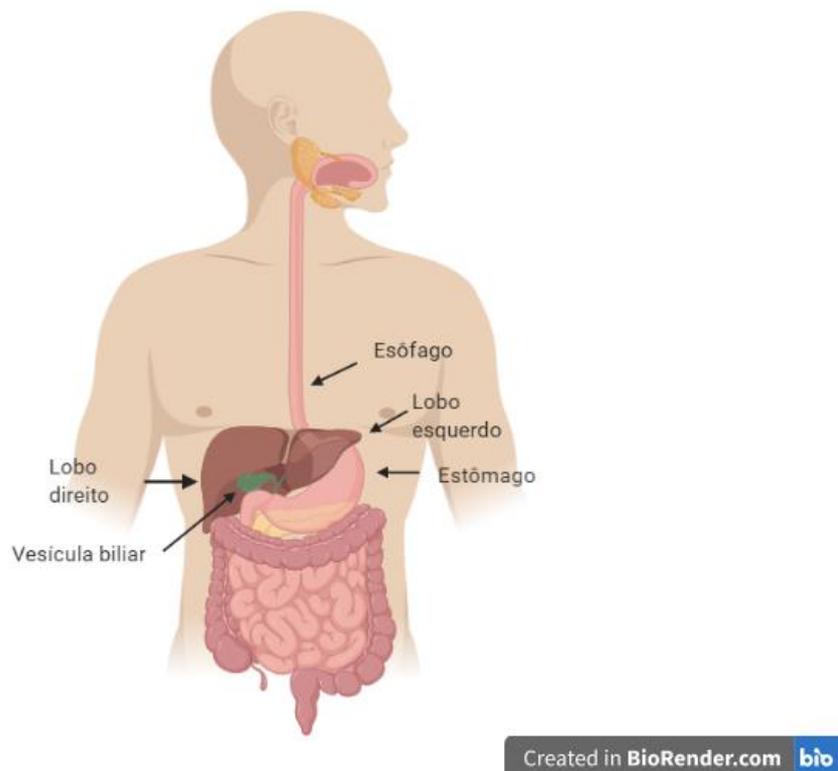
Entre esses produtos, destaca-se a silimarina, um flavonoide extraído da espécie vegetal *Silybum marianum*, que tem apresentado bons resultados, sobretudo pelos efeitos antioxidantes refletidos na elevação dos níveis hepáticos de glutathione (SURAI, 2015; TALEB *et al.*, 2018). β -glucanas (BGs), polissacarídeos naturais presentes em animais, plantas, fungos e bactérias, apresentam diferentes efeitos biológicos positivos, incluindo ações antioxidantes, imunomoduladoras, anticâncer e hepatoprotetoras (CHEN *et al.*, 2011; VETVICKA, 2014; WANG *et al.*, 2014; KAYA *et al.*, 2016); Deste modo, este estudo pretende avaliar os efeitos da β -glucana extraída do Kefir na prevenção e tratamento da IHA induzida pelo APAP em camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiologia hepática

O fígado é a maior glândula do corpo, correspondendo a aproximadamente 2% da massa corporal em um adulto de 70kg. Anatomicamente, está localizado no quadrante superior direito parcialmente protegido pela caixa torácica (figura 1); apresenta 4 lobos assimétricos denominados de lobos direito, esquerdo, quadrado e caudado (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010; BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013). É um órgão que recebe sangue pela artéria hepática e também pela veia porta-hepática, o que o torna um dos tecidos com maior perfusão sanguínea do corpo, algo em torno de 1,5 L de sangue por minuto, dos quais 70 % é drenado pela veia porta e 30% pela artéria hepática (KAN; MADOFF, 2008).

Figura 1 – Localização anatômica do fígado. Relações anatômicas do fígado com a vesícula biliar, estômago, duodeno e pâncreas.

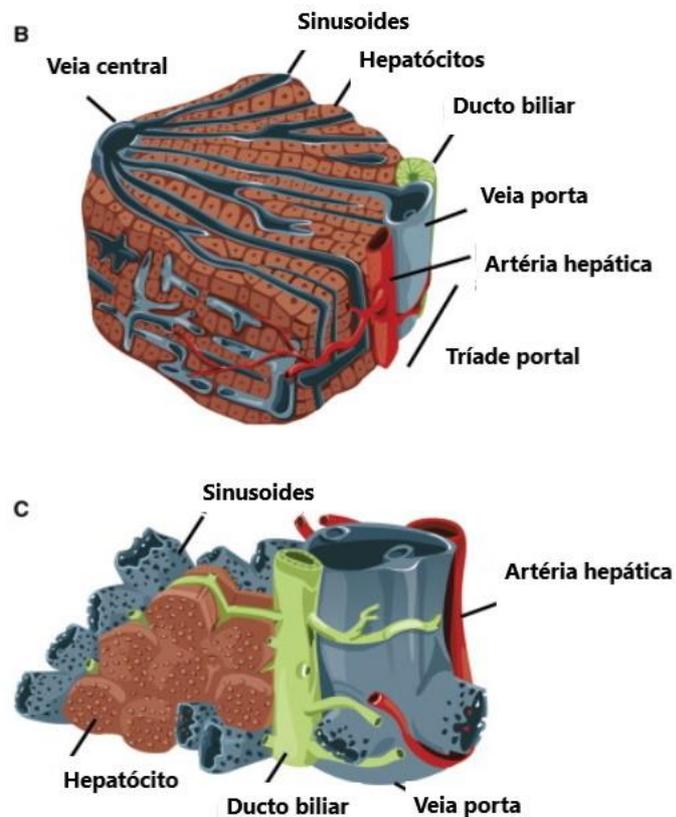


Fonte: Figura criada pela autora através de ferramenta disponível no site: <https://biorender.com/>.

Morfologicamente, o tecido hepático é formado por parênquima composto majoritariamente de hepatócitos (~70%) que corresponde a aproximadamente 80% do volume do órgão e é considerada sua unidade funcional (BLOUIN; BOLENDER; WEIBEL, 1977).

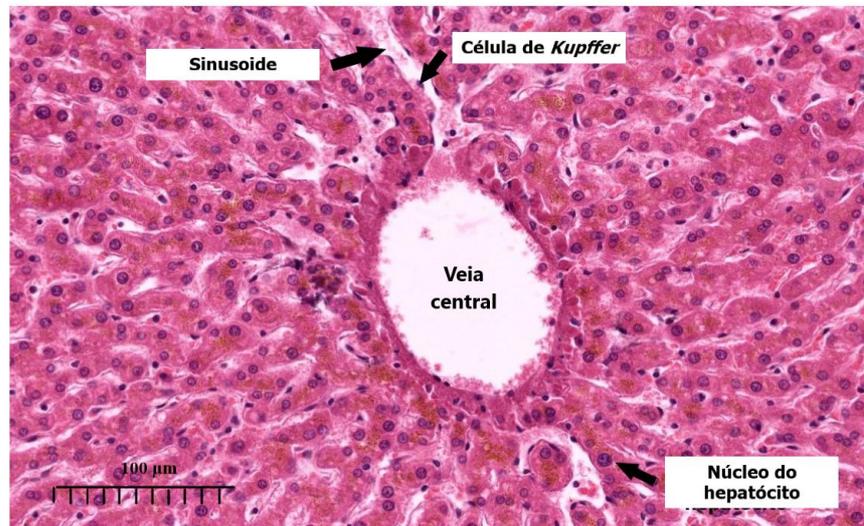
As demais células não parenquimatosas são : (a) células endoteliais dos sinusoides hepáticos que correspondem a 45% das células não parenquimatosas (figura 2) ; (b) células satélite que armazenam vitamina A e são capazes de produzir tecido cicatricial na presença de dano tecidual; (c) macrófagos residentes denominados de células de *Kupffer* que correspondem a 33% das células não parenquimatosas e de 80 a 90% de todos os macrófagos do corpo, conferindo a este órgão uma importante função imunológica (figura 3) (BLOUIN; BOLENDER; WEIBEL, 1977; SHWARTZ; GOESSLING; YIN, 2019; WISSE *et al.*, 1996; WU; ZERN, 2000).

Figura 2 - Citoarquitetura do fígado. B: Estrutura geral do lóbulo hepático; C: Relação entre os compartimentos celulares



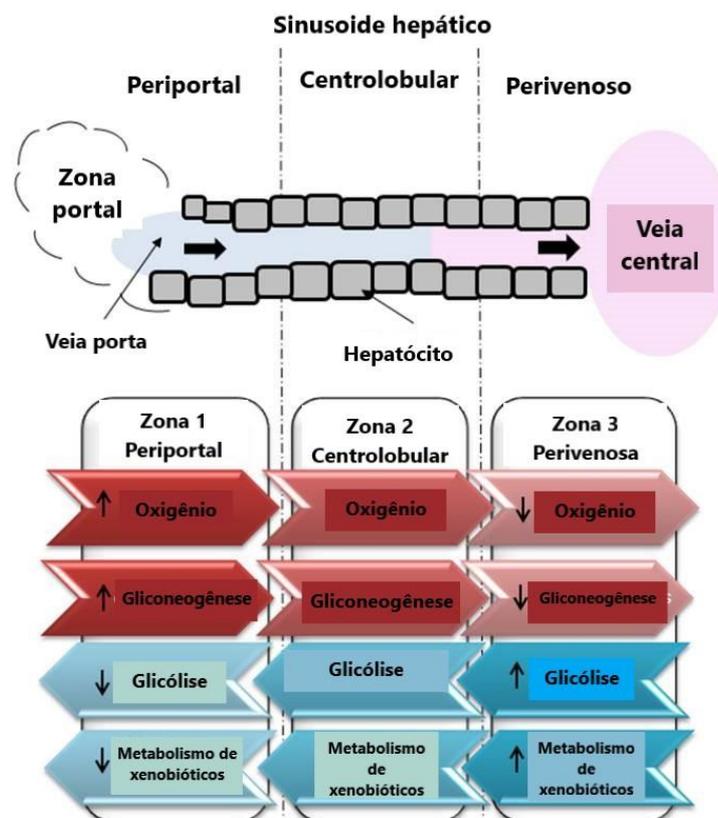
Fonte: Adaptada de Si-Tayeb, Lemaigre e Duncan (2010).

Figura 3 – Micrografia de lóbulo hepático humano saudável. Coloração hematoxilina e eosina. Objetiva 40X.



Fonte: Medical Histology Collection disponível em <http://www.histologyguide.com/>

Figura 4 – Zonas de metabolismo do fígado. A zona periportal recebe uma maior irrigação de sangue e oxigênio comparada a perivenosa. Quanto maior o aporte de oxigênio, mais elevado o metabolismo oxidativo.



Fonte: Adaptada de Tomlinson et al. (2019).

Os lóbulos hepáticos são divididos em 3 zonas que diferem entre si pela função desempenhada pelos hepatócitos (figura 4). A zona 1 fica adjacente a veia porta e recebe maior suprimento sanguíneo, participando assim das reações de metabolismo oxidativo; a zona 3 é composta por hepatócitos que circundam a veia central e é onde são metabolizados os fármacos, já a zona 2, tem função mista (VERNON; KASI, 2019).

O fígado é uma glândula anexa ao sistema digestório que desempenha funções exócrinas e endócrinas essenciais para a manutenção da homeostase corporal (BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013). A função exócrina é caracterizada pela produção e liberação da bile no trato digestório, enquanto atua de forma endócrina secretando somatomedinas, sob o estímulo do hormônio do crescimento (GH). Além destas, também produz angiotensinogênio e trombopoetina (SI-TAYEB; LEMAIGRE; DUNCAN, 2010).

É um órgão que participa do controle e integração do metabolismo de nutrientes, tais como vitaminas lipossolúveis, carboidratos, lipídios e síntese proteínas plasmática, por exemplo: albumina, protrombina e fibrinogênio (GALLI *et al.*, 2017; RUI, 2014). Somado a isso, reações de detoxificação e depuração de xenobióticos nos hepatócitos acontecem mediadas pela família do citocromo P450 (FRIEDMAN, 2008; STANGER, 2015). Quando há um desequilíbrio associado a perda funcional, as células entram em estado de apoptose causando lesão no órgão. Estas lesões podem ser classificadas em agudas ou crônicas de acordo com o tempo de duração e diferentes etiologias as quais envolvem inflamação, necrose, fibrose, cirrose e tumoração (DEMIREN *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2015).

2.2 Estresse oxidativo

A formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) acontece de forma fisiológica e são importantes para diferentes processos de sinalização celular. As mitocôndrias são a principal fonte através da cadeia transportadora de elétrons (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

Durante o metabolismo oxidativo, os EROS são intermediários da redução tetravalente do O_2 que resulta na formação da molécula de água, gerando as espécies reativas como o superóxido (O_2^-), formado após a primeira redução do oxigênio, radical hidroperoxila (HO_2^-), o radical hidroxila (OH^-), formada na penúltima etapa de redução do oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio *singlet* (1O_2), (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além dos EROS, as espécies reativas de nitrogênio são resultantes do metabolismo dos aminoácidos

entre eles o óxido nítrico (NO^\cdot) e peroxinitritos (ONOO^\cdot) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O óxido nítrico é uma molécula que desempenha funções fisiológicas importantes como a manutenção do desempenho durante o exercício físico, regulação da pressão e fluxo arterial, além de participar da biogênese e respiração mitocondrial (MCDONAGH *et al.*, 2019). Sua atuação como agente protetor ou tóxico dependerá do local de acúmulo e de sua concentração (JUNG *et al.*, 2006). Em menores quantidades, atua como segundo mensageiro em mecanismos que envolvem a enzima citocromo c oxidase (SHIVA *et al.*, 2005). Já o peroxinitrito é formado pela ligação do NO^\cdot ao ânion superóxido (O_2^\cdot). O aumento dessa produção está relacionado ao mecanismo do estresse oxidativo, onde a maior concentração de O_2^\cdot depleta o NO^\cdot disponível interferindo no desempenho das funções do óxido nítrico e consequentemente estimulando o estresse nitrosativo através da nitração de proteínas (STEINHORN; LAKSHMINRUSIMHA, 2020).

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem afetar diversos componentes celulares, mas as membranas plasmáticas são especialmente afetadas por estes. Quando esses interagem com os lipídios insaturados presentes na membrana das células, ocorre a peroxidação lipídica (EHLERS; TODD, 2017). A peroxidação lipídica resulta em destruição da estrutura e do mecanismo de regulação de trocas de metabólitos e até a morte celular (MAHATTANATAWEE *et al.*, 2006).

No intuito de minimizar os níveis dessas espécies reativas, durante a evolução foram desenvolvidos sistemas de defesa antioxidantes que podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (GUTMANN *et al.*, 2020). O sistema enzimático é composto, entre outras, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A superóxido dismutase catalisa a reação de conversão do ânion superóxido (O_2^\cdot) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), menos reativo (MULLER *et al.*, 2006). Por outro lado, a catalase regula a concentração de H_2O_2 convertendo em água (H_2O) nos peroxissomos (CAO; LENG; KUFÉ, 2003).

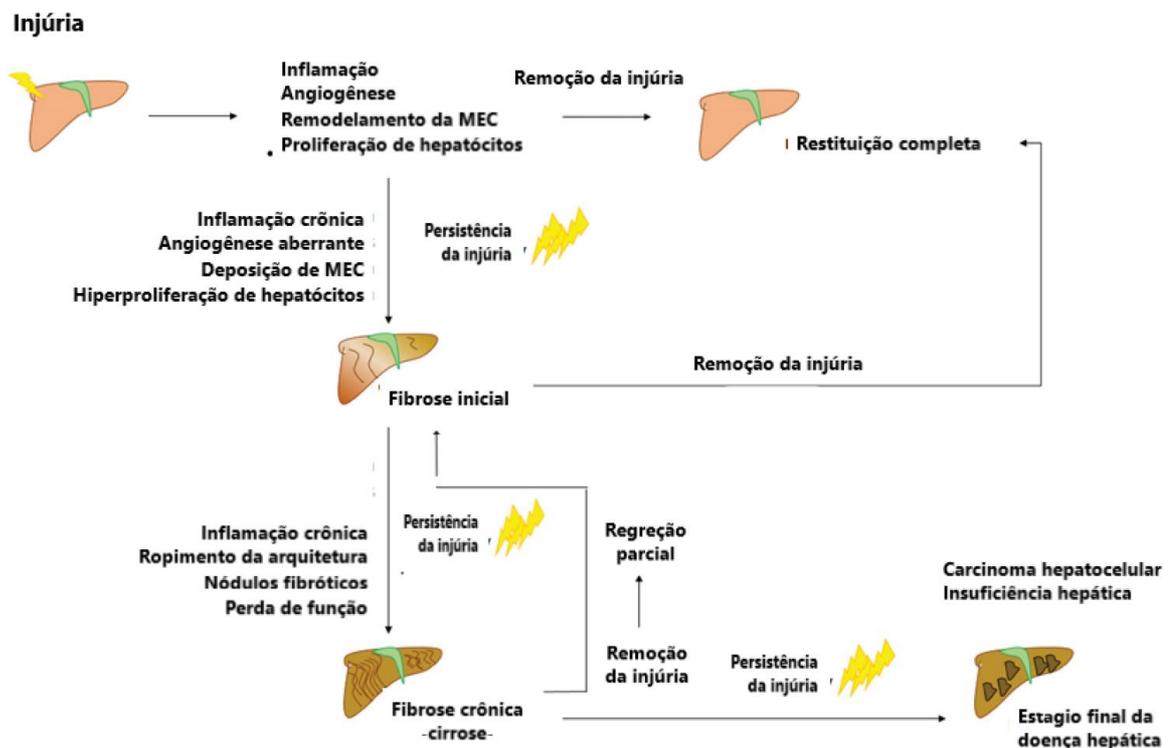
Já o sistema antioxidante não enzimático é composto por moléculas antioxidantes como a glutathione, vitamina A, C e E (GUTMANN *et al.*, 2020). A glutathione na sua forma reduzida (GSH) é a biomolécula antioxidante mais importante produzida intrinsecamente. Seu grupo sulfidril (-SH) participa de reações de conjugação e redução as quais são essenciais para o metabolismo de xenobióticos (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

O estresse oxidativo acontece quando há uma depleção desses agentes antioxidantes ou um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes. Esse tipo de estresse pode ser um gatilho para o desenvolvimento de doenças agudas e crônicas por ter a produção de ATP e sobrevivência das células afetada (BARBOSA *et al.*, 2010).

2.3 Tipos de Lesões hepáticas

As lesões hepáticas podem ser classificadas a partir da etiologia e do tempo de exposição ao agente agressor, como pode ser observado na figura 5.

Figura 5 - Fibrose na lesão hepática aguda versus crônica. A lesão aguda é caracterizada por inflamação, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (MEC) associado com proliferação de hepatócitos.



Fonte: Adaptado de Campana e Iredale (2017).

Nota: Caso o agente agressor seja retirado, ocorre a recuperação do fígado. Se a injúria persistir, a inflamação aguda torna-se crônica com deposição da matriz extracelular, exacerbação da angiogênese e perda progressiva da função podendo evoluir até cirrose ou carcinoma hepatocelular se o insulto não for interrompido.

Lesão hepática crônica (LHC)

A lesão hepática crônica (LHC) caracteriza-se por uma deterioração das funções hepáticas decorrentes de complicações de doenças de base como as hepatites virais, esteatose

não alcoólica além do etilismo (OLSON, 2016). Nos países ocidentais, o estilo de vida obesogênico e o consumo excessivo de álcool são as principais causas da doença hepática crônica (GAO; BATALLER, 2011; MARRA; LOTERSZTAJN, 2013).

A fibrose hepática resultante da lesão crônica piora o prognóstico de pacientes hepatopatas (ALTAMIRANO-BARRERA; BARRANCO-FRAGOSO; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2017). Sua origem está relacionada a cascata de ativação das células satélites a partir da inflação instalada. Uma vez ativados, os macrófagos produzem mais citocinas pró-inflamatórias estimulando as células satélite a produzir matriz extracelular (MEC) rica em colágeno que se acumula no tecido hepático (LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015).

As enzimas conhecidas como matriz metaloproteinases (MMPs) são responsáveis pela homeostase da MEC em organismos saudáveis. Na doença hepática crônica, a ativação das células satélite estimula a atividade dos inibidores dessas enzimas e consequente aumento da fibrose (RODERFELD, 2018). Em estágios iniciais, a fibrose pode ser revertida quando o agente agressor é descontinuado. Nesse contexto, ocorre apoptose através das células *natural killer* (NK), diminuição dos inibidores das MMPs e da produção de colágeno hepático (LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015; PELLICORO *et al.*, 2014).

Lesão hepática aguda (LHA)

A lesão aguda desenvolve-se através da disfunção dos hepatócitos sem a existência prévia de doença hepática (LEE, 2012). Tem etiologia multifatorial que inclui fatores geográficos, genéticos e socioeconômicos (RAJARAM; SUBRAMANIAN, 2018). Pode ser classificada ainda em três tipos, de acordo com o aparecimento de desordens de coagulação e neurológicas: hiperaguda, aguda, subaguda (O'GRADY *et al.*, 1989). A lesão hepática induzida por medicamentos (LHIM) é a causa mais relevante desse tipo de injúria nos países ocidentais, com destaque para os Estados Unidos da América (EUA) (LEE, 2013).

Embora a avaliação histopatológica de uma LHIM na maioria dos casos não apresentar um padrão claro de injúria, como acontece com a doença hepática crônica e gordurosa, sua utilização é importante para determinar a gravidade e o manejo clínico mais adequado (KLEINER, 2017).

A LHIM pode ser classificada como idiossincrática (dose-independente) e intrínseca (dose-dependente) (MOSEDALE; WATKINS, 2017). A primeira acontece raramente e ainda

é subdividida em alérgica e não alérgica (KAPLOWITZ, 2005). Já a intrínseca tem desenvolvimento previsível e o APAP é, isoladamente, o fármaco principal responsável pelo desenvolvimento da insuficiência hepática aguda (IHA) (LEE, 2003). Esse tipo de lesão representa um problema de saúde pública com registro de médio de 38.000 internações por ano nos Estados Unidos da América, segundo levantamento realizado entre 1998-2011 (MAJOR *et al.*, 2016).

2.4 Acetaminofeno (APAP): metabolismo hepático e toxicidade

O acetaminofeno (APAP) pertence à família de analgésicos derivados da anilina sintetizado pela primeira vez no final do século XIX a partir da fenacetina, um analgésico já conhecido (BRUNE; RENNER; TIEGS, 2015). Naquele momento, o APAP mostrava-se como uma possível alternativa mais eficiente, já que a fenacetina apresentava como efeito colateral o surgimento de cianose devido a produção de metemoglobina (FLINN; BRODIE, 1948). Porém, com o aumento da utilização do acetaminofeno nos anos posteriores, elevaram-se os casos de superdosagem com quadro de hepatotoxicidade seguida de morte (LEE, 2004).

Em doses terapêuticas, a via preferencial de metabolização é na fase II que consiste na glicuronidação e sulfatação (figura 6). Na forma conjugada, os metabólitos são eliminados através da urina (PRESCOTT, 1980). A glicuronidação é catalisada pelas UDP (uridina-difosfato de glicose) glicosiltransferase (UGT), as quais adicionam um resíduo de açúcar, o que aumenta a solubilidade da molécula (MACKENZIE *et al.*, 2011). Já a sulfatação é mediada pelas sulfotransferases e corresponde a via principal do metabolismo do acetaminofeno em neonatos, já que estes apresentam uma reduzida concentração endógena de UGT (ADJEI *et al.*, 2008).

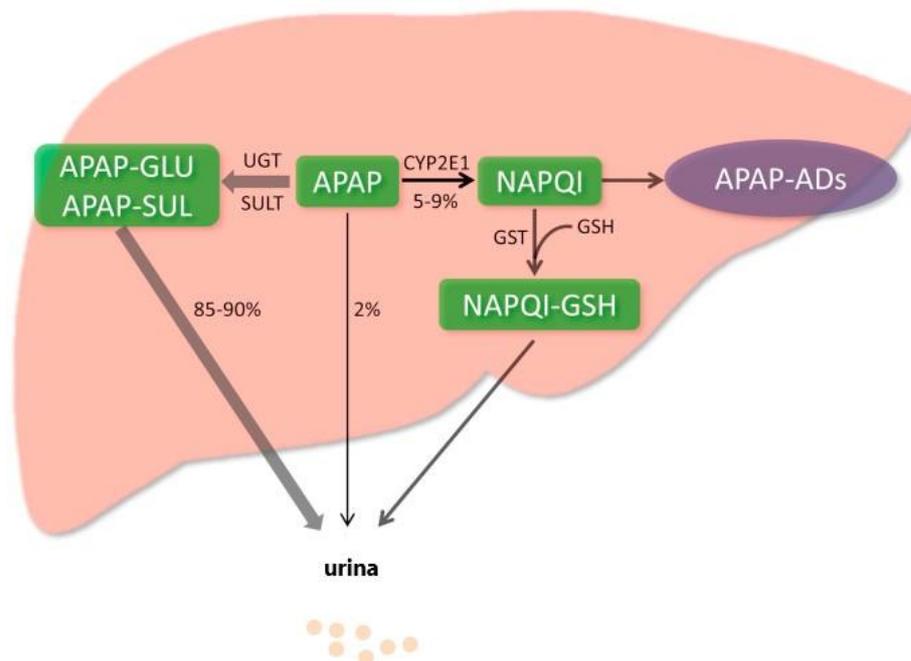
Uma menor parcela do acetaminofeno sofre uma reação de oxidação, fase I, mediada por enzimas do Citocromo P450 (CYP). Nos seres humanos e camundongos, o acetaminofeno é metabolizado pelas isoformas CYP2e1 e CYP1a2 (ZAHER *et al.*, 1998). Nesse processo, há a produção do metabólito tóxico N-acetyl-p-benzoquinona imina (NAPQI) (JAESCHKE; XIE; MCGILL, 2014). Este produto é então inativado através da de sua conjugação com glutathione reduzida (GSH), porém esse processo é limitado quando há um excesso de produção de NAPQI, como ocorre na overdose (QIU; BENET; BURLINGAME, 2001).

Por este motivo, o metabólito produzido na fase I do metabolismo é responsável pela hepatotoxicidade quando há um consumo exacerbado deste medicamento, visto as vias de

glicuronidação e sulfatação ficarem saturadas associada à depleção do GSH (MAST; DARDEVET; PAPET, 2018). Com a diminuição desse estoque, o NAPQI não conjugado ao complexo enzimático liga-se covalentemente a proteínas celulares causando oxidação de grupos sulfidrila, o que determina intenso estresse oxidativo e necrose celular (HE *et al.*, 2012).

A formação de adutos com as proteínas da membrana das mitocôndrias provocam a desregulação da permeabilidade da membrana, o que gera intenso estresse oxidativo por interferir na cadeia transportadora de elétrons e consequente diminuição da produção de ATP (MASUBUCHI; SUDA; HORIE, 2005).

Figura 6 - Metabolismo do acetaminofeno: a via preferencial de metabolização é na fase II onde ocorre a glicoronidação e sulfatação.



Fonte: Adaptada de Yan *et al.* (2018).

Nota: Em casos de overdose, o metabolismo é desviado para a via do Citocromo P450, gerando o metabólito NAPQI. Com a diminuição do estoque de GSH, o NAPQI forma adutos protéicos gerando estresse oxidativo e morte celular. APAP, acetaminofeno; UGT, UDP-glicuronosiltransferase; SULT, sulfotransferase; CYP 2E1, Citocromo P450 2E1; NAPQI, N-acetil-p-benzoquinona imina; GSH, glutatona; APAP-ADs, APAP aduto proteico.

2.5 Utilização do kefir na medicina alternativa

O kefir é uma bebida fermentada de origem asiática preparada a partir de grãos de kefir adicionados ao leite ou a uma matriz de sacarose e água (FARNWORTH, 2008; GULITZ *et al.*, 2011). Os grãos de kefir correspondem a um conjunto de microrganismos, dentre os quais: bactérias lácticas e leveduras (KIM *et al.*, 2015b). Ao serem adicionados ao leite ou à água com açúcar, promovem a fermentação produzindo uma bebida que terá composição variável de acordo com o tipo de substrato utilizado, a microbiota já existente e as condições em que se desenvolveu a fermentação (ALTAY *et al.*, 2013).

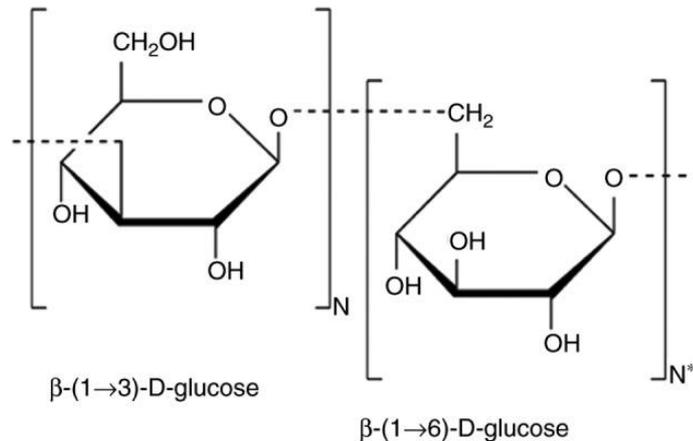
Estudos têm demonstrado a ação benéfica do kefir no sistema imunológico e atuação como fator antioxidante (FRANCO *et al.*, 2013; MERT *et al.*, 2018). Esses efeitos são atribuídos principalmente aos exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelos organismos simbióticos que compõem os grãos de kefir. Os EPS também apresentaram efeito sobre controle do ganho de peso e níveis de lipídios sanguíneos (LIM *et al.*, 2017). Além dessas ações, o kefir demonstrou atuar na redução do estresse oxidativo associado à redução da progressão do diabetes em ratos (PUNARO *et al.*, 2014).

A capacidade antioxidativa do kefir também foi refletida em estudo que observou atenuação dos efeitos na lesão hepática provocada por inseticida (EL GOLLI-BENNOUR *et al.*, 2019). Este fato reforça o interesse por seus mecanismos de ação na diminuição do estresse oxidativo mitocondrial e possíveis benefícios na insuficiência hepática induzida por outros compostos como o acetaminofeno.

2.6 β -glucana (BG)

As β -glucanas (BG) são polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de cereais, fungos e bactérias (HARTLAND *et al.*, 1994). São denominados dessa forma devido à predominância das ligações entre suas moléculas, ou seja, ligações beta-glicosídicas dos tipos 1-3, 1-4 e 1-6 (Figura 7). A proporção de cada tipo de ligação varia de acordo com a fonte e irá determinar a sua solubilidade e conseqüentemente sua velocidade de fermentação (TIWARI; SINGH; JHA, 2019).

Figura 7 - Estrutura molecular da β -glucana.



Fonte: (SIMA; VANNUCCI; VETVICKA, 2018).

Entre os cereais ricos em BG, destacam-se a aveia e cevada, que apresentam aproximadamente 4,5% dessa fibra em sua composição (CHO; PAMELA J, 1993). Como representantes do Reino Fungi, tem-se o cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) e as leveduras. Assim como os grãos de Kefir vem ganhando destaque na produção desse polissacarídeo (KIM *et al.*, 2015a). Estudos têm evidenciado possíveis benefícios da utilização da β -glucana no tratamento de doenças como diabetes, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares e câncer (SOFI, SA; SINGH, 2017).

A maioria das fibras alimentares tem ação anti-glicemiante como é o caso das BG (SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014) como pode ser observado no estudo de Andrade *et al.*, (2016), no qual a administração de BG associada ou não ao exercício físico obteve uma redução nos níveis de glicose e hemoglobina glicada em animais diabéticos.

No entanto, uma meta-análise feita por He *et al.*, (2016) concluiu que a ação hipoglicemiante e aumento da sensibilidade a insulina provavelmente não é um efeito exclusivo do polissacarídeo isolado, mas sim, uma associação da ação dos componentes do cereal do qual é extraído. A partir dessa visão, leva-se a pensar que a forma íntegra da fonte, nesse caso da aveia, obteria resultados mais satisfatórios. Outra revisão abrangente sobre o tema destaca que há evidências dos benefícios da ingestão de fibras por diabéticos do tipo II. Porém, destaca que estes devem ser analisados com cautela vista a heterogeneidade dos dados estatísticos (HE *et al.*, 2016).

Em relação aos níveis de lipoproteínas de baixa densidade, a ação das BG acontece por vias distintas das estatinas (SIMA; VANNUCCI; VETVICKA, 2018). Seu efeito dá-se pela formação de gel polissacarídeo na mucosa intestinal que diminui a reabsorção dos sais biliares. Consequentemente, o colesterol circulante é utilizado para produção desses sais no fígado, reduzindo seus níveis no sangue (KUIPERS; BLOKS; GROEN, 2014).

Sua atuação no sistema imunológico, especialmente sobre os macrófagos, é apontada como ponto de partida para alguns de seus efeitos, como exemplo, a atividade anti-tumoral. A via apoptótica é a mais provável de ser ativada pela ação da BG, o que resulta na diminuição da velocidade de proliferação do tumor (LEI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016).

A BG tem demonstrado também efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro* como a estimulação de enzimas antioxidantes e a proteção contra danos ao DNA por ação das espécies reativas de oxigênio (CEYHAN *et al.*, 2012; REVERBERI *et al.*, 2005; SLAMENŇOVÁ *et al.*, 2003).

Recentemente, foi identificada a presença de β -glucanas (BGs) como componente dos EPS dos grãos de kefir (HONG *et al.*, 2019). Neste contexto, torna-se importante verificar se essa β -glucana obtida do kefir tem ações antioxidantes, o que o tornaria um agente hepatoprotetor sobre a insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno.

3 HIPÓTESE

O pré-tratamento e o tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir tem efeito hepatoprotetor na insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana derivada do kefir na insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos.

4.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do pré-tratamento da β -glucana íntegra e hidrolisada, assim como do tratamento agudo com a β -glucana hidrolisada sobre:
- Perfil bioquímico plasmático;
- Verificar a variação da massa corporal durante o pré-tratamento;
- Dosar os marcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar as alterações histopatológicas

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção da β -glucana do kefir

A β -glucana íntegra e hidrolisada obtidas do kefir de água foram cedidas pelo Laboratório de Biofísica Química da Universidade Federal de Pernambuco – *Campus Recife* e seu processo de extração encontra-se sob sigilo de patente.

5.2 Modelo Experimental de Insuficiência Hepática Aguda (IHA) induzida por Acetaminofeno (APAP).

5.2.1 Animais

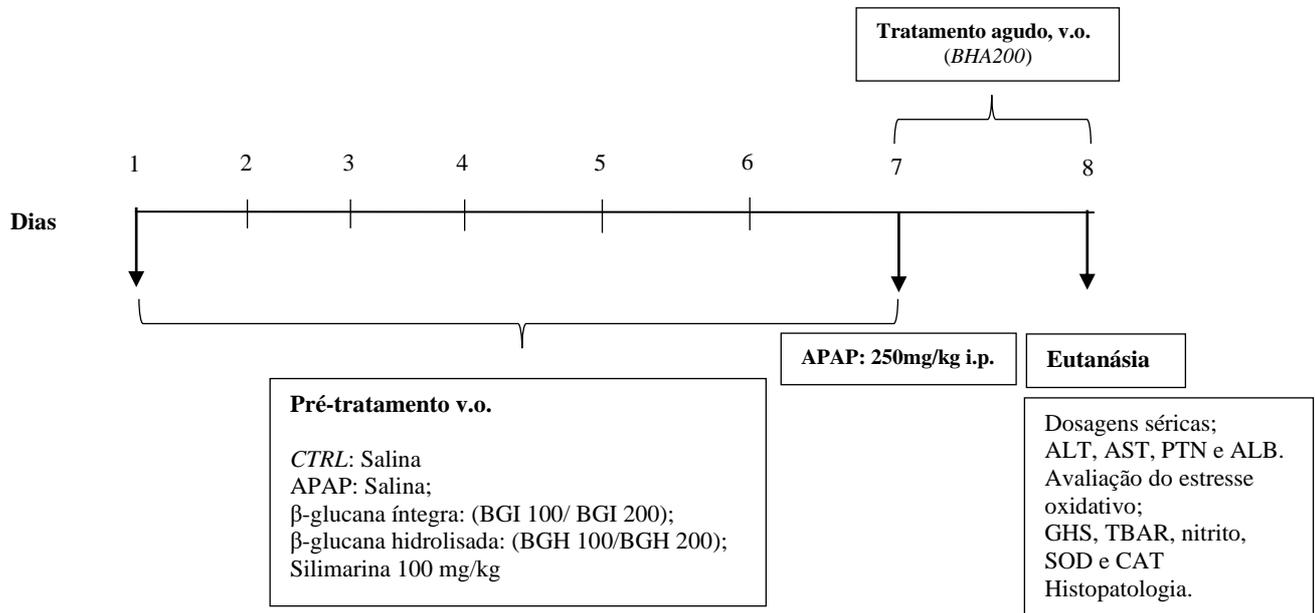
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss (30- 40g), entre 8 e 12 semanas de vida proveniente do biotério do Laboratório federal de defesa agropecuária (Lanagro) e biotério do departamento de fisiologia e farmacologia. Os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com acesso livre a água e alimentados com ração industrializada própria para roedores da marca Labina® normocalórica e normoproteica enriquecida com vitaminas e minerais. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais de biotério foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (CEUA) com protocolo n°: 23076. 033864/2018-67 (Anexo A).

5.2.2 Desenho experimental

5.2.2.1 Formação dos grupos

Os animais foram distribuídos randomicamente em oito grupos com n= 5 a 10 cada: Controle (CTRL); acetaminofeno (APAP); BG íntegra 100 mg/kg (BGI 100) e 200 mg/kg (BGI 200); BG hidrolisada 100 mg/kg (BHI 100) e 200 mg/kg (BHI 200); BG hidrolisada administrada agudamente 200mg/kg (BHA 200); silimarina 100 mg/kg (SIL 100).

Figura 8 - Desenho experimental para avaliação do efeito hepatoprotetor da β -glucana extraída do kefir em modelo de insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP) em camundongos APAP: acetaminofeno; v.o: via oral; i.p: intraperitoneal.



Fonte: Autora.

Nota: ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; PTN, proteínas totais; ALP – albumina; GHS – glutatona; TBAR – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SOD, superóxido dismutase; CAT – catalase.

A escolha das doses utilizadas foi feita de acordo com estudos prévios que demonstraram que a BG não era tóxica nessas concentrações, assim como a dose de APAP utilizada não apresentou letalidade em modelos animais (ÇETIN, 2019; PAPAČKOVA *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Os animais do grupo controle e APAP receberam pré-tratamento por gavagem durante 7 dias, os demais grupos foram pré-tratados com BGI, BGH ou silimarina por igual período. Foi utilizada agulha curva de ponta arredondada própria para camundongos. No sétimo dia de pré-tratamento, foi induzida IHA com APAP (250mg/kg i.p.) nos grupos experimentais. A agulha utilizada foi do tipo hipodérmica descartável tamanho 13 x 0,45 26G ½. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% aquecida (40°C) na mesma proporção do volume do APAP. Não foi excedido o volume de 2 ml na administração por animal (Figura 8).

5.2.2.2 Diluição da β -glucana íntegra (BGI)

Inicialmente foi calculado o peso total dos animais. Com este dado, a BG foi pesada de acordo com a quantidade necessária para a respectiva concentração. Utilizou-se a

proporção de 6:1 de salina em microlitros em relação a massa em miligramas do animal. Para a dose de 200 mg/kg, foi necessário acrescentar o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) na solução salina na concentração de 1% com objetivo de melhorar a solubilidade da BG.

Após ser adicionada a solução salina 0,9%, a solução foi agitada no vórtex e posteriormente, com ajuda da agulha de gavagem, o conteúdo foi aspirado e devolvido até dissolver completamente a BG. Quando totalmente solubilizada, a BG tem aparência viscosa, levemente esbranquiçada e turva.

5.2.2.3 Diluição da β – glucana hidrolisada (BGH)

Com o peso dos animais, foi calculada a quantidade necessária. A proporção de salina foi a mesma utilizada na íntegra. A solução salina 0,9% foi aquecida a 40°C em chapa aquecedora e adicionada a BG. Observou-se que após esse processo, foram formados cristais que eram diluídos com auxílio mecânico da agulha de gavagem igual ao descrito anteriormente.

5.2.2.4 Diluição da silimarina

A silimariana foi diluída em solução de carboximetilcelulose (0,5%). A proporção de 10:1 da solução em relação a massa do animal em miligramas.

5.2.2.5 Diluição do acetaminofeno

O produto utilizado foi o 4-Acetamidophenol, N-(4-Hydroxyphenyl) Sigma ® Ref: a-7085-100. Foi utilizado como solvente a solução de carboximetilcelulose (0,5%) aquecida a 40 ° C. A solução foi colocada em becker de 10 ml no agitador magnético a temperatura de 40°C, coberto com parafilm (importante evitar evaporação) até completa diluição. Foi utilizada a proporção 15:1 em relação a massa do animal em miligramas.

5.2.3 Eutanásia

No oitavo dia do experimento, os animais foram anestesiados com solução contendo cetamina (0,9 ml/kg) e xilazina (0,1ml/kg) de massa corporal (FISH, E.R., BROWN, M.J., DANNEMAN, P.J, KARAS, 2008). Todo procedimento foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo (LNEM) da UFPE. O campo de cirurgia foi montado em ambiente limpo e com pouco ruído para evitar estresse do animal.

Após a aplicação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais até que a sedação estivesse estabelecida. Tomou-se o cuidado para que os animais que ainda seriam anestesiados não tivessem contato visual do local de cirurgia.

Antes do início da cirurgia, foram verificados os reflexos de preensão plantar dos animais através de leve preensão com pinça da pata traseira. Caso ainda houvesse resposta, a anestesia era aprofundada através de isoflurano. Durante todo procedimento, o animal foi monitorado quanto aos reflexos, repetindo se necessário, o processo de aprofundamento com isoflurano para evitar dor ou desconforto animal.

Com o animal devidamente anestesiado, o sangue foi obtido através do plexo orbital com auxílio de tubo capilar de acrílico de 75 mm. Depois foi feita uma abertura na cavidade abdominal através de pequena incisão na região do peritônio. Posteriormente, foram submetidos à perfusão com salina a 0,9% com consequente exsanguinação. Após esse momento, foram retirados fígado e rins, além do coração, o que associado a exsanguinação, comprovaram a morte do animal.

Todo manejo foi feito em horário previamente fixado durante o turno da manhã. A carcaça foi colocada em saco plástico branco identificado e armazenado em freezer próprio para este fim. A UFPE possui contrato com empresa especializada que recolhe estas carcaças e as incinera seguindo todo protocolo sanitário vigente. Todos os envolvidos fizeram uso de equipamentos de proteção individual durante todas as etapas do experimento.

5.2.4 Análise do perfil bioquímico

O sangue obtido através do plexo foi posto em eppendorf e centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos para obtenção de soro. Feito isso, o soro foi transferido com auxílio de pipeta e subdividido para as análises bioquímicas. Foram separados 25 µl de soro para análise da alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotranferases hepáticas. Para albumina (ALB) e proteínas totais (PTN), foram utilizadas 10 µl e 20 µl respectivamente. Os testes bioquímicos foram feitos com kits da marca Labtest®. Foi seguido o protocolo do fabricante. Quando essas amostras não foram utilizadas no mesmo dia, permaneceram mantidas a - 20°C.

5.2.5 Massa corporal

A massa corporal individual foi quantificada diariamente até o oitavo dia do experimento com auxílio de balança digital com capacidade até 10000 g.

5.2.6 Análise dos marcadores de estresse oxidativo

O tecido hepático foi homogeneizado com adição de tampão tris-base 50 mM e antiproteases PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e ortovanadato de sódio de concentração 1 mM. Após esse processo, foram centrifugados a 0°C em 3600 rpm durante 10 minutos. Do sobrenatante, 120 µl foram coletados para as análises de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); 120 µl para glutathiona (GSH) e 100 µl nitrito (WU *et al.*, 2017). Também foram feitas análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – 200 µl e proteínas pelo método de Bradford (20 µl) (BRADFORD, 1976).

5.2.6.1 Determinação da Concentração de malonaldeído (MDA)

A peroxidação lipídica (LPO nos homogenatos de fígado foi estimada colorimetricamente através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR) (BUEGE; AUST, 1978), com algumas adaptações. Em resumo, foi adicionado homogenato (80 a 100 µg de proteína) a 0,2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 30% e 0,2 mL de solução de TRIS-HCL. Após, foram centrifugados e ao sobrenatante adicionado o mesmo volume de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,73% e aquecida a 95 °C durante 15 min. Após o resfriamento até temperatura ambiente, 0,3 ml do sobrenadante foram coletadas e estimadas as absorbâncias a 535 nm. Os valores de malondialdeído (MDA) foram expressos em mM/mg de proteína.

5.2.6.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade total da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com o método de Misra; Fridovich, (1972). Os sobrenadantes (0,03 mL), recolhidos a partir de fígado homogeneizado após centrifugação, foram incubados com 0,920 mL de carbonato de sódio 0,1M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1mM (pH10,2) a 37 °C. Foram adicionados trinta milimoles por litro de epinefrina (em ácido acético a 0,05%) e a atividade de SOD a 37°C foi medida pela cinética de inibição da auto-oxidação de epinefrina a 480 nm e o decaimento da absorbância foi acompanhada por 90 segundos (MISRA E FRIDOVICH, 1972). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína

necessária para inibir a auto oxidação de 1 μmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.2.6.3 Determinação da Atividade da Catalase

Foram retirados 0,06 ml do homogeneizado dos tecidos para medir a atividade da CAT de acordo com o método descrito por Aebi, (1984). O princípio do ensaio baseia-se na determinação da constante de velocidade (k) da decomposição de H_2O_2 , definida como $4,6 \times 10^7$. A constante de velocidade da enzima foi determinada medindo a variação na absorvância (240 nm) por minuto durante um período de 4 minutos a 30°C (AEBI, 1984), em um meio de reação, contendo tampão fosfato 50mM (pH=7,0) amostra e H_2O_2 (300mM). Uma unidade de CAT será definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 μmol de H_2O_2 por minuto em H_2O . Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.2.6.4 Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Para dosagem da glutathiona reduzida, foram adicionados 0,05 ml do homogeneizado dos tecidos ao tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) contendo EDTA, 5 mM com oftaldialdeído (OPT, 1 mg / mL) à temperatura ambiente durante 15 min. A intensidade de fluorescência foi medida com excitação de 350 nm e comprimentos de onda de emissão. Utilizou-se a N-etilmaleimida para evitar interferências da GSH na medição (HISSIN; HILF, 1976). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.2.6.5 Determinação dos níveis de nitrito

Os níveis de óxido nítrico foram medidos com base na estimativa de nitrito total que foi obtida pela reação de Greiss. Foram adicionados 100 μL do homogenato dos tecidos a 100 μL de reagente de Greiss e medida em placas de 96 poços a 570 nm utilizando um espectrofotômetro. As concentrações de nitrito foram calculadas usando uma curva padrão que variava de 100 a 1,56 μM de nitrito de sódio (NaNO_2). Os níveis de nitrito foram expressos como μM .

5.3 Análise histopatológica

Para análise histopatológica, aproximadamente 500mg de tecido hepático foram coletados para avaliação histopatológica. O tecido foi fixado em solução de formalina e passaram por processo de diafanização. Posteriormente emblocados em parafina histológica e corados com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico (KLEINER *et al.*, 2005).

5.4 Análise Estatística

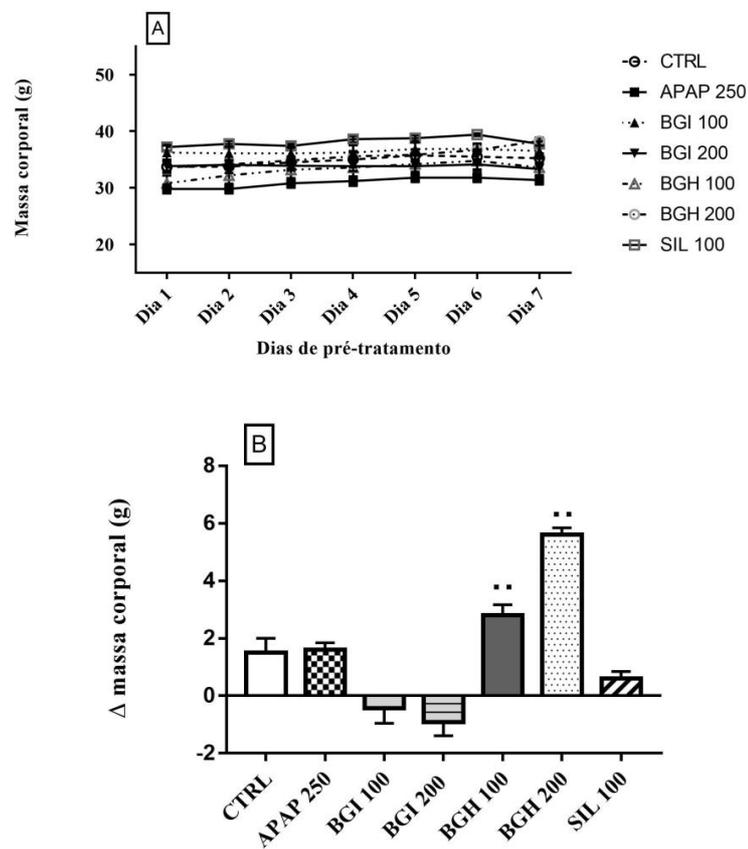
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). Para análise de distribuição normal dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro Wilk. Para a análise múltipla de dados foi feita a análise de variância de via única (*one way ANOVA*) ou de via dupla (*two way ANOVA*) dependendo do tipo de dado, seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal Wallis para não-paramétricos. O nível de significância foi considerado maior ou igual a 95% ($p < 0,05$). Para análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 7®.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito da β -glucana (BG) extraída do kefir na lesão hepática aguda induzida por acetaminogeno (APAP) em camundondos

Não foi observada alteração no ganho de massa corporal nos animais pré-tratados com a β -glucana íntegra (BGI) extraída do kefir (Figura 9). O grupo pré-tratado com 100mg/kg e 200mg/kg da BG hidrolisada (BGH) aumentou de modo dose dependente o ganho ponderal em ~2X e ~4X, respectivamente. A silimarina não induziu alterações de ganho ponderal.

Figura 9 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β - glucana extraída do kefir na massa corporal total em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).



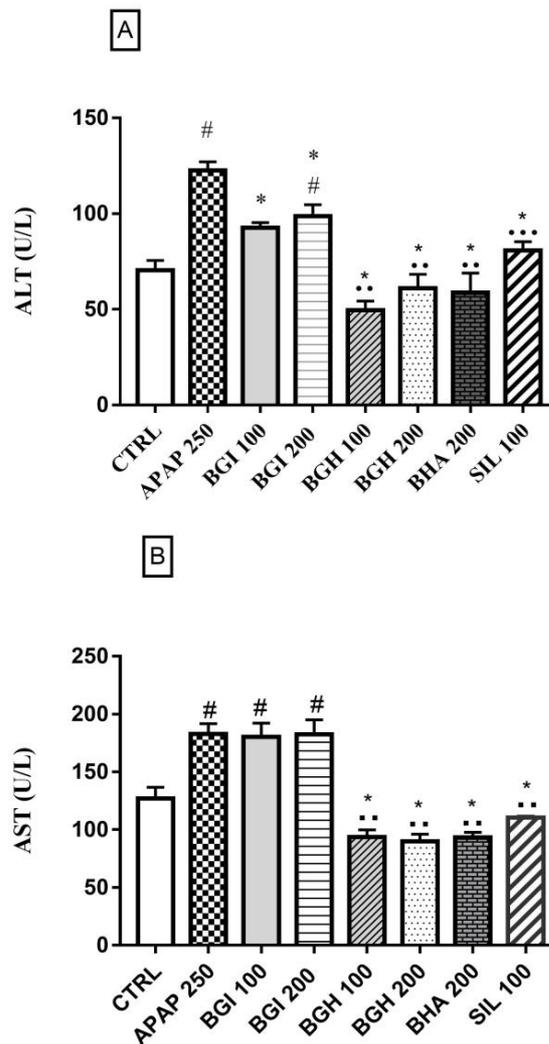
Fonte: Autora.

Nota: Δ = massa final – massa inicial. Dados expressos em média \pm EP. ** $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β - glucana íntegra; BGH: β - glucana hidrolisada; BHA: β - glucana hidrolisada dose única; SIL: Silimarina Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA TWO WAY (A) e ANOVA ONE WAY (B) Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

O acetaminofeno (APAP) gerou, após 24h de exposição aguda, um aumento nos níveis séricos da alanina amino transferase (ALT, 122,55 vs 70,43 U/L do controle, $p < 0,05$) e

aspartato amino transferase (AST, 182,83 vs 121,64 U/L do controle, $p < 0,05$). Os animais pré-tratados com a BG íntegra (BGI) reduziram os níveis séricos da ALT (~25%, $p < 0,05$) sem alterações nos níveis da AST em ambas as doses avaliadas (figura 10).

Figura 10- Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT,A) e aspartato (AST, B) aminotransferases em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP).



Fonte: Autora.

Nota: Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI; ***: $p < 0,05$ versus BGH. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10.

Já os animais pré-tratados com 100mg/kg e 200mg/kg da BG hidrolisada (BGH) reduziram os níveis das transaminases hepáticas (~50%). Os animais tratados imediatamente antes a indução da IHA com a BG hidrolisada (BGH) reduziram em 50% os níveis séricos de ambas as transaminases hepáticas (Figura 10).

Estes efeitos foram similares ao pré-tratamento com a silimarina (SIL), produto natural isolado das sementes do *Silybum marianum* e utilizado no tratamento da IHA (SOLEIMANI *et al.*, 2019). O APAP reduziu os níveis plasmáticos de proteínas totais (PTN, 4,53 vs 5,82 g/dl do controle), o que foi melhorado nos grupos BGI 200 mg/kg (~30%) e BGH 100mg/kg (25%), sem efeitos para o grupo tratado com 200mg/kg de BGH. Curiosamente, o tratamento com a BHA não preveniu a redução dos níveis de PTN (Tabela 1). A IHA induzida pelo APAP reduziu os níveis plasmáticos de albumina (1,43 vs 2,13 g/dl do controle), porém não houve alteração nos grupos BGI, BGH e BHA (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de proteínas totais (PTN) e albumina (ALB) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).

	CTRL	APAP 250	BGI 100	BGI 200	BGH 100	BGH 200	BHA 200	SIL 100
Proteínas totais	5,82 \pm 0,36	4,53 \pm 0,08 [#]	5,52 \pm 0,19 [*]	5,84 \pm 0,13 [*]	5,65 \pm 0,06 [*]	4,98 \pm 0,23	4,19 \pm 0,42 ^{#**}	6,09 \pm 0,09 ^{* **}
Albumina	2,13 \pm 0,34	1,43 \pm 0,07 [#]	1,56 \pm 0,11	1,79 \pm 0,11	1,9 \pm 0,12	1,85 \pm 0,11	1,64 \pm 0,11	1,75 \pm 0,08

Fonte: Dados do estudo.

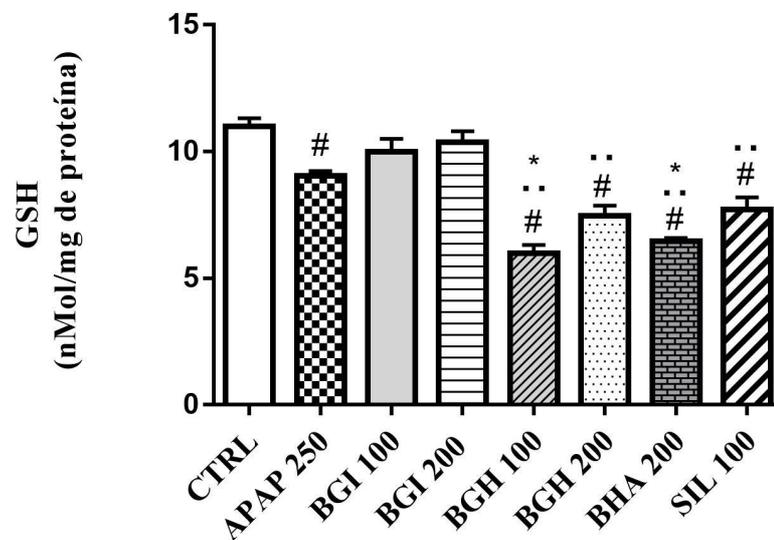
Nota: Dados expressos em média \pm EP. * p < 0,05 versus APAP; ** p < 0,05 versus BGI. n = 5 a 10. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina; Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA ONE WAY Pós-teste: Tukey. # p < 0,05 versus CTRL;

6.2 Efeito da β -glucana do kefir nos marcadores de estresse oxidativo

A IHA induzida pelo APAP provocou a redução dos níveis de GSH (9,045 \pm 0,19 vs 10,99 \pm 0,33 mMol/mg.proteína do controle), acompanhado dos maiores níveis de malondialdeído (MDA, 2,65 \pm 0,03 vs 1,57 \pm 0,01 mMol/mg.proteína do controle) e nitrito (2,12 \pm 0,013 vs 1,48 \pm 0,15 mMol/mg.proteína do controle) e da menor atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, 6,82 \pm 1,00 vs 19,64 \pm 2,64 U/mg de proteína do controle), sem alterações na atividade da enzima catalase (CAT). O pré-tratamento com a BG íntegra

preveni a redução nos níveis de GSH hepáticos, o que não foi observado nos grupos BGH 100, BGH 200 e BHA 200 (figura 11). Houve redução nos níveis de MDA nos grupos BGI 200 (40%), BGH 100 (70%), BGH 200 (50 %) e sem alterações no grupo BGI 100. No grupo BHA 200, houve redução nos níveis de MDA semelhantes à BGH 100 (figura 12).

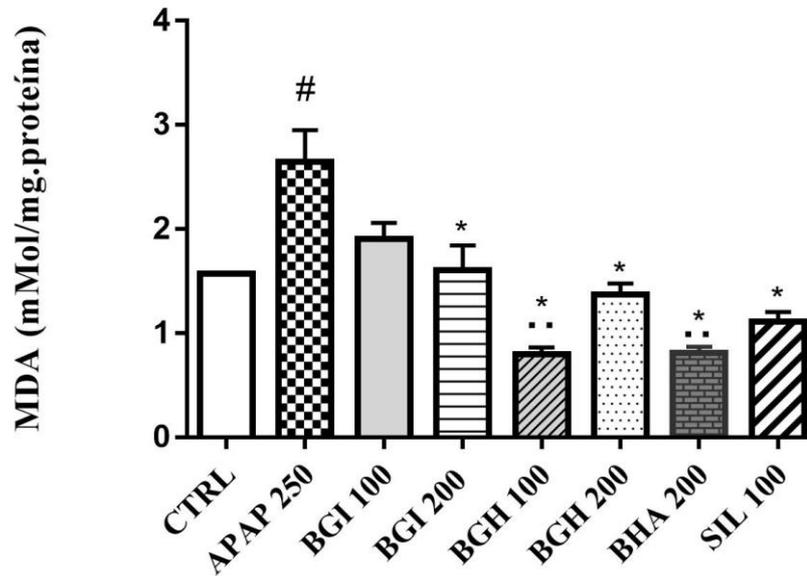
Figura 11 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de glutathiona (GSH) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).



Fonte: Autora.

Nota: Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; ·: $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10.

Figura 12 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).



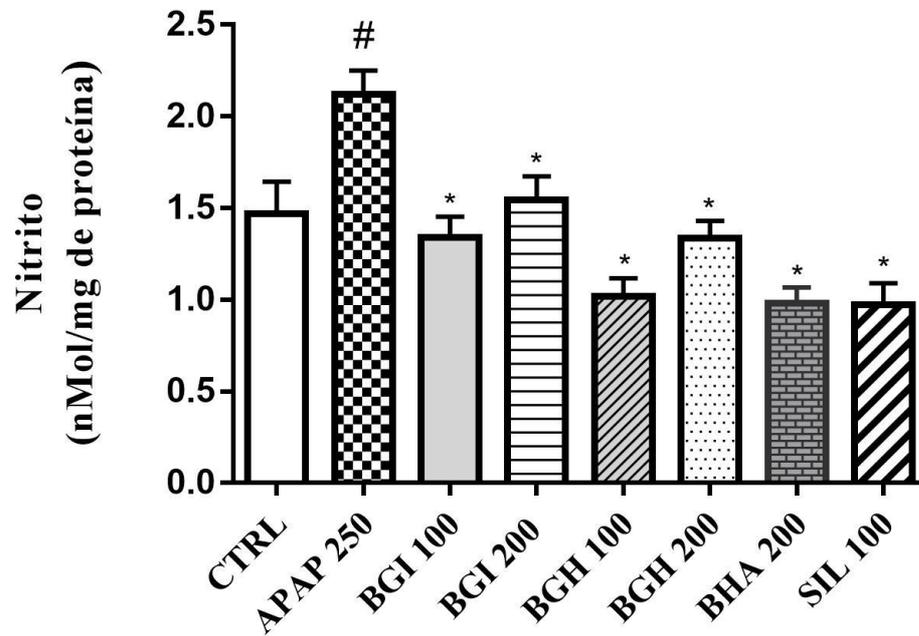
Fonte: Autora.

Nota: Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI. APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada dose única. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

Como observado na figura 13, a produção exacerbada de espécies reativas de nitrogênio induzida pelo APAP foi atenuada com o pré-tratamento com a BG nos grupos BGI 100 (~40%), BGI 200 (~30%), BGH 100 (~50%), BGH 200 (~40%) e BHA 200 (~55%), com clara tendência de melhor resultados nos grupos que utilizaram BGH.

O pré-tratamento com BG íntegra, em ambas as doses avaliadas, estimulou a atividade da SOD (1,5X). O pré-tratamento com a BGH na maior dose ou o tratamento agudo (BHA) mostrou uma forte tendência na estimulação da atividade dessa enzima (figura 14).

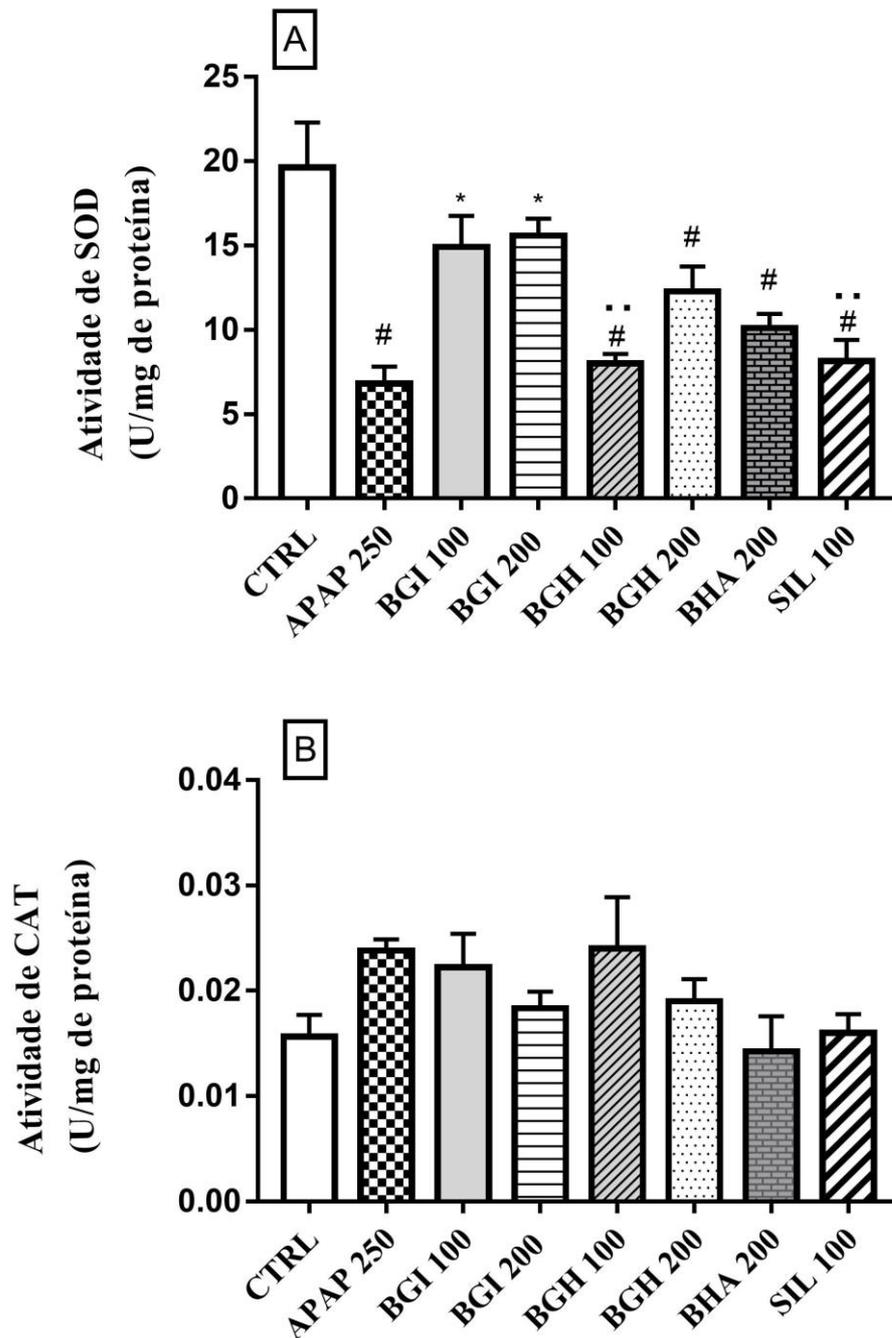
Figura 13 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de nitrito em camundongos com insuficiência hepática induzida pelo acetaminofeno (APAP).



Fonte: Autora.

Nota: Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10.

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD, A) e catalase (CAT, B) no fígado de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP).

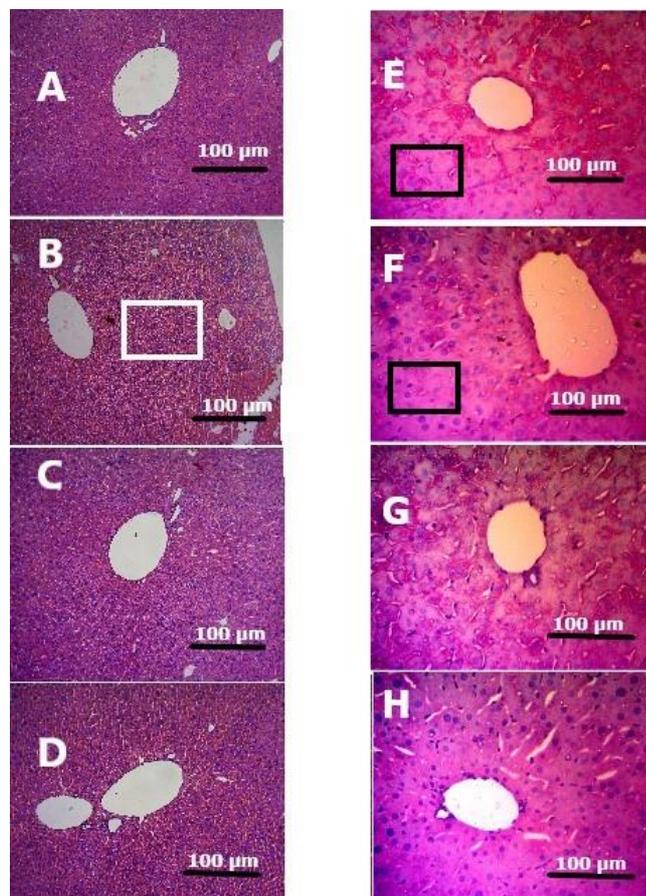


Fonte: Autora.

Nota: Dados expressos em média \pm EP; #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; ::: $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10.

As análises histopatológicas confirmaram a Insuficiência Hepática Aguda induzida pelo APAP, sobretudo pela necrose centrolobular moderada, desestruturação do parênquima hepático, ingurgitação dos sinusoides e presença de vacuolização, destacado na figura 15 B, quando comparado ao grupo CTRL que apresentou morfologia normal (figura 15 A). O pré-tratamento com a BGH reduziu a desorganização do parênquima hepático, sobretudo nos grupos BGH (figura 15 E e F).

Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com β -glucana do kefir na morfologia hepática de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP).



Fonte: Autora.

Nota: Área delimitada por retângulo branco: desestruturação do parênquima hepático, ingurgitação dos sinusoides e presença de vacuolização. Área delimitada por retângulos pretos: áreas do hepatócito com indícios de recuperação estrutural do parênquima após o pré-tratamento com a beta-glucana hidrolisada nas doses de 100 e 200 mg/kg respectivamente. A: Controle; B: Acetaminofeno; C: β -glucana íntegra 100 mg/kg; D: β -glucana íntegra 200 mg/kg; E: β -glucana hidrolisada 100 mg/kg; F: β -glucana hidrolisada 200 mg/kg; G: β -glucana dose aguda 200 mg/kg; H: Silimarina; VC: veia centrolobular. Coloração hematoxilina-eosina. Objetiva 10x e 40x da esquerda para direita.

7 DISCUSSÃO

O paracetamol (acetaminofeno, APAP) é amplamente utilizado na clínica por suas ações analgésicas, antipiréticas e fracamente anti-inflamatórias. Embora o uso terapêutico seja bem tolerado, o uso abusivo, consciente ou não, gera urgências médicas importantes, sobretudo pelo desenvolvimento da insuficiência hepática aguda (IHA) (LV *et al.*, 2013)). Embora a n-acetilcisteína (NAC) seja a única opção para o tratamento da IHA induzida pelo APAP, seu uso é limitado pelos efeitos adversos (DEMIROREN *et al.*, 2018), o que torna essencial a busca por novas estratégias de prevenção e/ou tratamento desta condição clínica. Neste sentido, as β -glucanas tem recebido muita atenção por seus efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e antioxidantes (XU *et al.*, 2016), razões pelas quais avaliamos o efeito da β -glucana (BG) derivada do Kefir íntegra e hidrolisada na insuficiência hepática aguda (IHA) induza por acetaminofeno em camundongos.

O tratamento com a BG íntegra (BGI) extraída do kefir não alterou o ganho ponderal, tampouco a ingestão alimentar (dado não mostrado) dos animais pré-tratados por 7 dias (Figura 8), ao contrário da BG hidrolisada (BGH) que aumentou o ganho ponderal, de modo dose dependente, sem alterações de consumo alimentar. Gudi *et al.*, (2019) mostrou que a partir do 5º dia, animais com colite e tratados com a BG extraída de leveduras ganharam massa corporal. De modo oposto, animais obesos tratados com BG isolada do fungo *Schizophyllum* reduziram o ganho ponderal induzido por dieta rica em gorduras (MUTHURAMALINGAM *et al.*, 2019). Os efeitos da BG no ganho de massa corporal podem estar associados aos efeitos anti-inflamatórios da BG, como observado em camundongos submetidos à inflamações intestinais (GUDI *et al.*, 2019), assim como, a prevenção no excesso de ganho massa corporal em condições inflamatórias crônicas como a obesidade (MUTHURAMALINGAM *et al.*, 2019). Esses achados estão relacionados à microbiota intestinal, maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino, especialmente o butirato, e maior sensibilidade a hormônios anabólicos importantes como insulina (MIYAMOTO *et al.*, 2018), o que pode, pelo em parte, explicar o ganho ponderal no grupo pré-tratado com a BGH.

Interessantemente, o tamanho da molécula de BG interferiu no ganho ponderal, uma vez que somente o grupo pré-tratado com a BGH aumentou o ganho de massa corporal. A BG extraída da aveia submetida à hidrólise enzimática diferenciada para originar moléculas de tamanho distintos mostrou que quanto menor a molécula maior a sua eficiência biológica, o

que foi expresso menor efeito sobre a redução do ganho ponderal de animais obesos (BAE *et al.*, 2009). Os efeitos das BG podem variar de acordo com a sua origem e tamanho/massa molecular, solubilidade e grau de polimerização de glicose (AIZAWA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019). Neste sentido, é razoável especular que a massa da molécula interfira nos efeitos sobre massa corporal, assim como a origem da BG e o estado de saúde do indivíduo, haja vista, os trabalhos citados se referem a redução ou ganho de massa em animais portadores de doenças metabólicas e inflamatórias.

Neste sentido, é possível que a BG extraída do kefir com menor tamanho em relação à BG íntegra tenha estimulado o ganho ponderal por aumento da eficiência energética, aumento do consumo alimentar e/ou redução do metabolismo basal. São questões não avaliadas no presente trabalho, mas que sugerem novos experimentos para se conhecer possíveis mecanismos através dos quais a BG hidrolisada gerou ganho de massa corporal em camundongos saudáveis.

Em doses terapêuticas, o APAP sofre ação de enzimas de conjugação e sulfatação (reações de fase II), o que gera metabólitos não tóxicos livremente excretados na urina. De 5 a 9% do APAP é convertido no metabólito tóxico N-acetil-p-benzoquinona (NAPQI) por ação das enzimas do complexo P450, sobretudo a CYP2E1 (JAESCHKE *et al.*, 2020; LARSON, 2007). Rapidamente, o NAPQI é detoxificado pela conjugação com a glutathiona (GSH). Entretanto, quando há saturação das enzimas hepáticas de fase II por super dosagem de APAP, a NAPQI é produzida, o que causa rápido consumo de GSH, ocasionando intenso estresse oxidativo, sobretudo mitocondrial, gerando a disfunção celular e a necrose tecidual (YAN *et al.*, 2018).

Neste estudo, a hepatotoxicidade induzida pelo APAP ficou evidente na avaliação morfológica e bioquímica. A análise histopatológica revelou necrose centrolobular, congestão dos sinusóides hepáticos e vacuolização tecidual, o que foi atenuado pelo tratamento com a BGH (figura 15). É bem descrito que o sítio de maior expressão da CYP2E1 é a região centrolobular, onde coincide com a maior produção de NAPQI e necrose hepática (LARSON, 2007), portanto, a região de maior interesse para avaliação dos danos teciduais provocados pelo APAP. O tratamento por 10 dias com β -glucana isolada do fungo *Saccharomyces cerevisiae* atenuou as principais alterações histopatológicas em camundongos, embora a dilatação dos sinusóides hepáticos tenha persistido (TOKLU *et al.*, 2006). O pré-tratamento por 7 dias com β -glucana extraída do fungo *Aureobasidium* sp. se mostrou eficiente na

proteção hepática contra o APAP (LEE *et al.*, 2009). BG são moléculas promissoras para hepatoproteção, inclusive em outros modelos de hepatotoxicidade, como a esteatose hepática alcoólica, no qual a Salecan, uma BG extraída de *Agrobacterium* sp., preveniu alterações hepatoestruturais em animais (CHEN *et al.*, 2012). Até onde conhecemos, este trabalho é inédito na avaliação do efeito hepatoprotetor da BG extraída do kefir.

Como observado nas figura 10, o APAP, após 24h, elevou os níveis séricos da alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, o que reflete uma lesão hepática aguda semelhante à observada em diferentes estudos (HASANEIN; SHARIFI, 2017; LEE *et al.*, 2009; TOKLU *et al.*, 2006). As transaminases são marcadores plasmáticos de lesões hepáticas de diferentes etiologias, tais como hepatites virais, doenças autoimunes, desordens metabólicas assim como a doença de Addison e hipotireoidismo, abuso de álcool e medicamentos como o paracetamol (DONG; NANCHAL; KARVELLAS, 2020; SENIOR, 2012).

De acordo com a expressão diferencial nos tecidos biológicos, a ALT é o principal marcador de dano hepático, cujo aumento plasmático informa necrose centrolobular, o que é coerente com as alterações histopatológicas observadas neste e em outros trabalhos (LI *et al.*, 2018; TOKLU *et al.*, 2006). O pré-tratamento com a BGI reduziu os níveis da ALT, enquanto a BGH reestabeleceu os níveis normais de ALT sérica em animais intoxicados, inclusive o grupo BHA. O pré-tratamento com a BGI não exerceu efeitos sobre os níveis de AST (figura 10 b). Toklu e tal (2006) relatou que a BG isolada de *S. cerevisiae* igualmente reduziu os níveis de ALT, sem efeitos importantes sobre os níveis de AST. Os efeitos da BGH sobre os níveis da ALT foram ainda mais potentes em relação à silimarina, o que sugere que a BGH tem ações hepatoprotetoras importantes em lesões agudas em camundongos.

É importante destacar que o tamanho da cadeia da BG parece ser importante para o efeito biológico avaliado, sobretudo para os efeitos de proteção do tecido hepático observados no grupo tratado com a BGH. Corroborar esta hipótese, o trabalho de Zyla *et al.*, (2019), que demonstrou que a BG de baixo peso molecular extraída da aveia apresenta uma redução do infiltrado linfocitário de caráter inflamatório no intestino de animais com colite. Além disso, que a BG hidrolisada e de baixo peso molecular apresenta efeito imunomodulador mais potente em virtude do aumento na proporção das ligações β 1-3, as quais são mais bem reconhecidas pelo receptor delectina do tipo 1. Este é o receptor mais bem caracterizado para o reconhecimento das BG, sobretudo as de ligação 1-3 (FESEL; ZUCCARO, 2016). Esta

proteína também tem papel importante na cascata que regula a regeneração hepática e na modulação de diferentes efeitos biológicas da BG (RAO *et al.*, 2014; VAUTIER; MACCALLUM; BROWN, 2012).

Além disso, os níveis plasmáticos de albumina (ALB) e proteínas totais (PTN) foram reduzidos pelo APAP (tabela 1) de modo semelhante ao observado em outros estudos (GAO *et al.*, 2018; HASANEIN; SHARIFI, 2017). Os níveis de ALB e PTN são índices igualmente importantes para avaliação clínica e experimental da função hepática (IHEGBORO *et al.*, 2018). A BGI e a BGH na menor dose utilizada estimularam a síntese de proteínas totais no fígado, o que não foi observado no grupo BGH 200 e BHA. Provavelmente, a BG estimule a síntese proteica no fígado, independentemente do tamanho da molécula, o que reforça a atividade protetora para o fígado desta BG. Os nossos dados sugerem que uma dose única não parece estimular agudamente a síntese hepática de proteínas, sendo necessário o pré-tratamento e/ou o uso continuado de BG.

O consumo da GSH induzida pela produção excessiva da NAPQI decorrente da dose excessiva do APAP gera intensa produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, que por sua vez promovem oxidação de macromoléculas como proteínas, peroxidação lipídica (LPO), disfunção mitocondrial e danos ao DNA celular, o que em conjunto está diretamente associado a patogenia da IHA (ABDEEN *et al.*, 2019; QIU; BENET; BURLINGAME, 1998). Neste trabalho, os dados séricos relacionados à disfunção hepática parecem estar diretamente correlacionados ao estresse oxidativo constatado na redução dos níveis de GSH e da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), assim como a elevação dos níveis de LPO (malondialdeído, MDA) e nitrito (figura 12 e 13) induzidos pelo APAP.

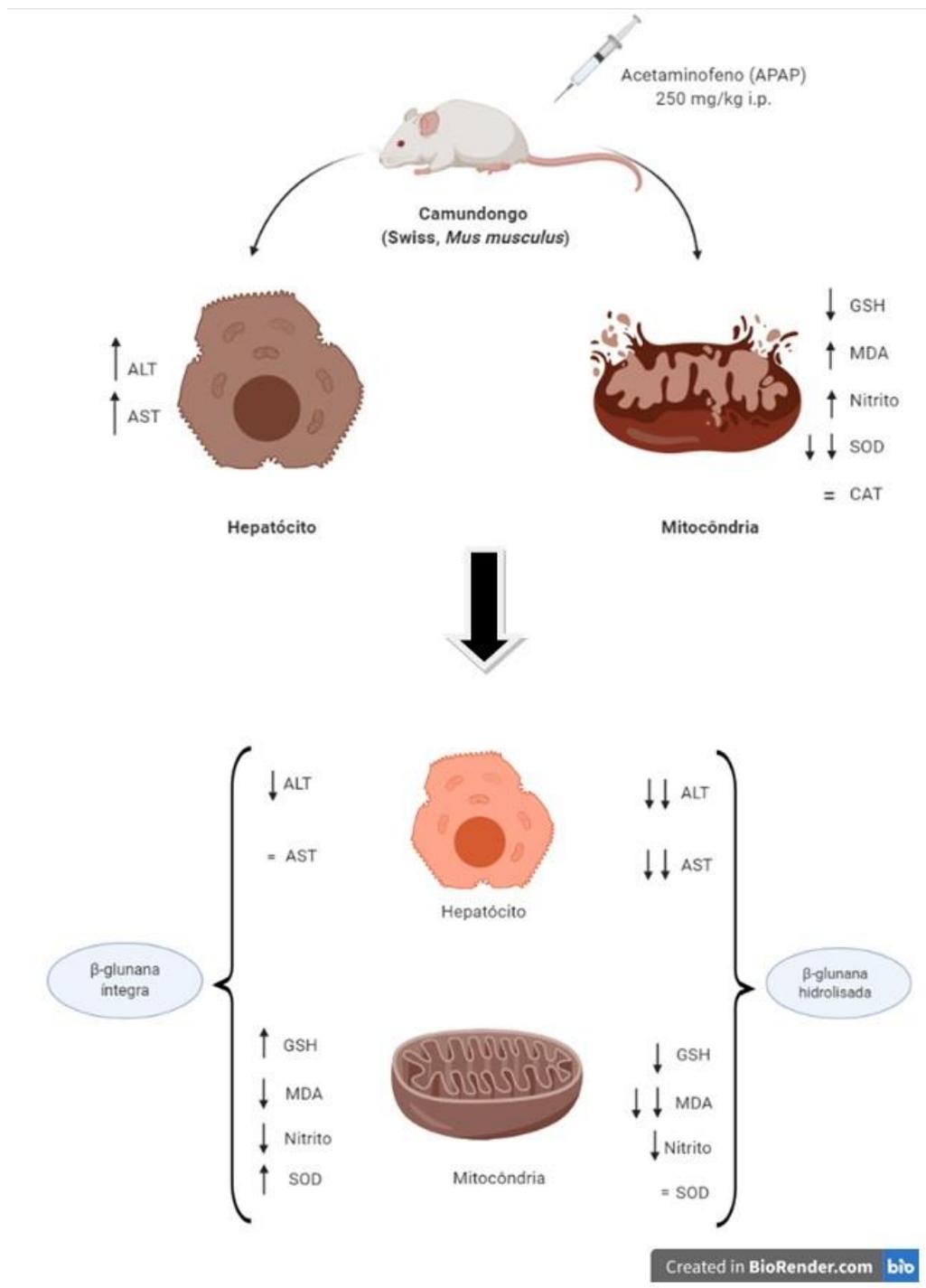
Somente a BGI atenuou o consumo excessivo de GSH em camundongos com IHA induzida pelo APAP (figura 11). De outro modo, os níveis de MDA e nitrito foram intensamente reduzidos pela BG, independentemente do tamanho da molécula, inclusive no grupo tratado agudamente (BHA) resultados semelhantes a estes foram vistos nos estudos prévios (TIEN *et al.*, 2014; WILCZAK *et al.*, 2015). No entanto, o melhor desempenho da BGI contraria os achados de Lei *et al.*, (2015), que destaca que o polissacarídeo de menor peso molecular teria capacidade antioxidante mais elevada possivelmente devido a sua maior solubilidade e consequente permeabilidade nas células (LEI *et al.*, 2015).

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) fazem parte do sistema

antioxidante enzimático que possui a função de defesa das células dos danos provocados pelos radicais livres (ALI *et al.*, 2020). Estudos têm demonstrado que esse sistema é afetado por doses altas de acetaminofeno, diminuindo assim a resposta antioxidante dos tecidos ao insulto do fármaco (HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010; JAESCHKE *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2018).

É necessário destacar que o efeito sobre a LPO e a formação de espécies reativas de nitrogênio foram mais evidentes na BGH, inclusive aguda. Consistente com estes dados, o estímulo da atividade da SOD foi observado no pré (BGI e BGH) e no tratamento agudo com a BHA. Sendo assim, nossos dados sugerem que a BG atenua a hepatotoxicidade induzida pelo APAP provavelmente por reduzir os níveis de estresse oxidativo e LPO. Os efeitos antioxidantes da BG, semelhantes aos encontrados neste trabalho, tem sido descrito na literatura em modelos de IHA induzida por APAP (TOKLU *et al.*, 2006), mas também em outras condições clinicamente importantes como doença intestinal inflamatória (WILCZAK *et al.*, 2015) e câncer de pulmão (CHOROMANSKA *et al.*, 2018), o que corrobora a ação antioxidante e hepatoprotetora da BG extraída do kefir. A figura 16 traz um esquema resumo com os principais resultados deste estudo.

Figura 16 – Esquema resumo dos resultados do estudo: Efeitos do pré-tratamento com a β -glucana obtida do kefir sobre a insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos.



Fonte: Figura criada através de ferramenta disponível no site: <https://biorender.com/>.

Nota: As setas para cima indicam elevação e as para baixo indicam redução. Setas duplas indicam que a redução foi mais acentuada. O sinal de igualdade indica que não houve diferença significativa. Figura criada através de ferramenta disponível no site: <https://biorender.com/>. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GSH: glutatona reduzida; MDA: malonaldeído; SOD: superóxido dismutase; i.p.: intraperitoneal.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a β -glucana extraída do kefir protege o tecido hepático contra a insuficiência hepática aguda induzida pelo acetaminofeno em camundongos, sobretudo por ações antioxidantes.

A BG hidrolisada parece ter maior eficiência na preservação morfofuncional do parênquima hepático o que reforça a importância de uso de BG de baixo peso molecular. Neste sentido, sugerimos que o uso da BG isolada do kefir pode representar uma estratégia na prevenção e/ou na redução dos danos hepáticos causados pelo uso abusivo do APAP e outros medicamentos.

9 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos nesta fase deste trabalho, torna-se interessante avaliar o potencial biológico da BG extraída do kefir, sobretudo hidrolisada, em outros modelos animais de condições clinicamente importantes, como doenças metabólicas e insuficiência hepática alcoólica.

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A. *et al.* Protective effect of cinnamon against acetaminophen-mediated cellular damage and apoptosis in renal tissue. **Environmental Science and Pollution Research**, Tamilnadu, v. 26, n. 1, p. 240–249, 1 jan. 2019.
- ABDEL-MISIH, S. R. Z.; BLOOMSTON, M. **Liver Anatomy Surgical Clinics of North America**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2010.
- ADJEL, A. A. *et al.* Interindividual variability in acetaminophen sulfation by human fetal liver: Implications for pharmacogenetic investigations of drug-induced birth defects. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, Reston, v. 82, n. 3, p. 155–165, 1 mar. 2008.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, New York, v. 105, p. 121–6, 1984.
- AIZAWA, M. *et al.* Low molecular-weight curdlan, (1→3)- β -glucan suppresses TLR2-induced RANKL-dependent bone resorption. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 41, n. 8, p. 1119–1125, 2018.
- ALI, S. S. *et al.* Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, United Kingdom, v. 44, n. 3, p. 01-13, 20 jan. 2020.
- ALTAMIRANO-BARRERA, A.; BARRANCO-FRAGOSO, B.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Management strategies for liver fibrosis. **Annals of Hepatology**, Mexico City, v. 16, n. 1, p. 48–56, 1 jan. 2017.
- ALTAY, F. *et al.* A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 167, p. 44–56, 2013.
- ANDRADE, E. F. *et al.* Exercise and beta-glucan consumption (*Saccharomyces cerevisiae*) improve the metabolic profile and reduce the atherogenic index in type 2 diabetic rats (HFD/STZ). **Nutrients**, Basel, v. 8, n. 12, 17 dez. 2016.
- BAE, I. Y. *et al.* Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice. **Food Hydrocolloids**, Netherlands, v. 23, n. 7, p. 2016–2021, out. 2009.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul. 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113–123, jan. 2006.
- BLOUIN, A.; BOLENDER, R. P.; WEIBEL, E. R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 72, n. 2, p. 441–455, 1977.
- BOGDANOS, D. P.; GAO, B.; GERSHWIN, M. E. Liver immunology. **Comprehensive**

Physiology, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 567–598, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRUNE, K.; RENNER, B.; TIEGS, G. Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. **European Journal of Pain**, London, v. 19, n. 7, p. 953–965, 1 ago. 2015.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302–310, 1 jan. 1978.

CAMPANA, L.; IREDALE, J. Regression of Liver Fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 37, n. 01, p. 001–010, 15 fev. 2017.

CAO, C.; LENG, Y.; KUFU, D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 32, p. 29667–29675, 8 ago. 2003.

ÇETIN, E. Pretreatment with β -glucan attenuates isoprenaline-induced myocardial injury in rats. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 104, n. 4, p. 505–513, 27 abr. 2019.

CEYHAN, A. M. *et al.* Protective effects of β -glucan against oxidative injury induced by 2.45-GHz electromagnetic radiation in the skin tissue of rats. **Archives of dermatological research**, Berlin, v. 304, n. 7, p. 521–527, 2012.

CHEN, P. *et al.* A novel soluble beta-glucan salean protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 75, n. 10, p. 1990–1993, 2011.

CHEN, P. *et al.* Protective effects of salean against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Journal of applied toxicology : JAT**, Philadelphia, v. 32, n. 10, p. 796–803, out. 2012.

CHO, K. C.; PAMELA J, W. Enzymatic Analysis of beta-Glucan Content in Different Oat Genotypes. **Cereal Chem**, Saint Paul, v. 70, n. 5, p. 539–542, 1993.

CHOROMANSKA, A. *et al.* High- and low-Molecular Weight oat Beta-Glucan Reveals Antitumor Activity in Human Epithelial Lung Cancer. **Pathology and Oncology Research**, Budapest, v. 24, n. 3, p. 583–592, 1 jul. 2018.

DEMIROREN, K. *et al.* A comparison of the effects of thymoquinone, silymarin and N-acetylcysteine in an experimental hepatotoxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 106, p. 1705–1712, 1 out. 2018.

DONG, V.; NANCHAL, R.; KARVELLAS, C. J. Pathophysiology of Acute Liver Failure. **Nutrition in Clinical Practice**, Silver Spring, v. 35, n. 1, p. 24–29, 1 fev. 2020.

EL GOLLI-BENNOUR, E. *et al.* Protective effects of kefir against deltamethrin-induced

hepatotoxicity in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 26, n. 18, p. 18856–18865, 7 jun. 2019.

FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods**. [s.l]: CRC Press, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 90, p. 53–60, 1 maio 2016.

FISH, E.R. *et al.* (Eds.). **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2008.

FLINN, F. B.; BRODIE, B. B. The effect on the pain threshold of N-acetyl p-aminophenol, a product derived in the body from acetanilide. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Baltimore, v. 94, n. 1, p. 76, set. 1948.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, Elmsford, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, 1 fev. 2009.

FRANCO, M. C. *et al.* Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 62, n. Pt_12, p. 1815–1822, 1 dez. 2013.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, Washington, v. 88, n. 1, p. 125–172, jan. 2008.

GALLI, F. *et al.* Vitamin E: Emerging aspects and new directions. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 102, p. 16–36, 1 jan. 2017.

GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 141, n. 5, p. 1572–1585, nov. 2011.

GAO, S. *et al.* Excessive Plasmin Compromises Hepatic Sinusoidal Vascular Integrity After Acetaminophen Overdose. **Hepatology**, Hoboken, v. 68, n. 5, p. 1991–2003, 1 nov. 2018.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage As A Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, New York, v. 53, n. SUPPL. 1, fev. 2004.

GUDI, R. *et al.* Pretreatment with Yeast-Derived Complex Dietary Polysaccharides Suppresses Gut Inflammation, Alters the Microbiota Composition, and Increases Immune Regulatory Short-Chain Fatty Acid Production in C57BL/6 Mice. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 150, n. 05, p. 1291-1302, 27 dez. 2019.

GULITZ, A. *et al.* The microbial diversity of water kefir. **International journal of food**

microbiology, Amsterdam, v. 151, n. 03, p. 284-288, 2011.

GUNNELL, D. *et al.* Studies to evaluate the impact of the 1998 UK legislation restricting pack sizes of paracetamol. *In*: GUNNELL, D. *et al.* **Multicentre programme of clinical and public health research in support of the National Suicide Prevention Strategy for England**. Southampton: NIHR Journals Library, 2013. p. 23-48.

GUTMANN, C. *et al.* Reactive Oxygen Species in Venous Thrombosis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 6, p. 1918, 11 mar. 2020.

HARTLAND, R. P. *et al.* The linkage of (1–3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 10, n. 12, p. 1591–1599, 1994.

HASANEIN, P.; SHARIFI, M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male wistar rats. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 55, n. 1, p. 1809–1816, 25 maio 2017.

HE, L. X. *et al.* The difference between oats and beta-glucan extract intake in the management of HbA1c, fasting glucose and insulin sensitivity: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Food and Function**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 1413–1428, 1 mar. 2016.

HE, M. *et al.* Effects and mechanisms of rifampin on hepatotoxicity of acetaminophen in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 3142–3149, 1 set. 2012.

HEARD, K. J. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 359, n. 3, p. 285, 17 jul. 2008.

HELAL, M. G.; SAMRA, Y. A. Irbesartan mitigates acute liver injury, oxidative stress, and apoptosis induced by acetaminophen in mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, Online ahead of print. e22447, p. 01-12, 2020.

HINSON, J. A.; ROBERTS, D. W.; JAMES, L. P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin, n. 196, p. 369–405, 2010.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 74, n. 1, p. 214–226, jul. 1976.

HONG, J. Y. *et al.* Short communication: Physicochemical features and microbial community of milk kefir using a potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* KU200284. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 102, n. 12, p. 10845–10849, 1 dez. 2019.

IHEGBORO, G. O. *et al.* Cytotoxic and Hepatocurative Effect of Aqueous Fraction of *Tapinanthus bangwensis* Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, Thousand Oaks, v. 23, 26 set. 2018.

JAESCHKE, H. *et al.* Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 65, n. 2, p. 166–176, 1 fev. 2002.

JAESCHKE, H. *et al.* Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver

Injury and Acute Liver Failure. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 174, n. 02, p. 159-167, 11 jan. 2020.

JAESCHKE, H.; XIE, Y.; MCGILL, M. R. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. **Journal of clinical and translational hepatology**, Hong Kong, v. 2, n. 3, p. 153–61, set. 2014.

JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Warszawa, v. 71, n. 1, p. 11–23, 2014.

JUNG, K. H. *et al.* Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. **Stroke**, Dallas, v. 37, n. 11, p. 2744–2750, nov. 2006.

KAN, Z.; MADOFF, D. C. Liver anatomy: microcirculation of the liver. **Seminars in interventional radiology**, New York, v. 25, n. 2, p. 77–85, jun. 2008.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, n. 6, p. 489–499, jun. 2005.

KAYA, K. *et al.* Beneficial effects of β -glucan against cisplatin side effects on the nervous system in rats 1. **Acta cirurgica brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 198–205, mar. 2016.

KIM, D.-H. *et al.* Detection and Enumeration of Lactic Acid Bacteria, Acetic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grain and Milk Using Quantitative Real-Time PCR. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 35, n. 1, p. 102–107, 1 fev. 2015a.

KIM, D.-H. *et al.* Rapid Detection of *Lactobacillus kefirianofaciens* in Kefir Grain and Kefir Milk Using Newly Developed Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 78, n. 4, p. 855–858, 1 abr. 2015b.

KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 1 jun. 2005.

KLEINER, D. E. Drug-induced Liver Injury: The Hepatic Pathologist's Approach. **Gastroenterology clinics of North America**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 273–296, 2017.

KUEHN, B. M. FDA focuses on drugs and liver damage: Labeling and other changes for acetaminophen. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 302, n. 04, p. 369-371, 22 jul. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622807>. Acesso em: 12 fev. 2020

KUIPERS, F.; BLOKS, V. W.; GROEN, A. K. Beyond intestinal soap - Bile acids in metabolic control. **Nature Reviews Endocrinology**, London, v. 10, n. 8, p. 488–498, 2014.

KUNA, L. *et al.* Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 19, n. 10, p. 830–838, 23 maio 2018.

LARSON, A. M. Acetaminophen Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v.

11, n. 3, p. 525–548, 1 ago. 2007.

LEE, J. W. *et al.* Effect of gamma irradiation on the efficacy of β -glucan against acetaminophen induced toxicity in mice. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 98–105, 15 jun. 2009.

LEE, W. Acute Liver Failure. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 33, n. 01, p. 36–45, 23 fev. 2012.

LEE, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 349, n. 05, p. 474–485, 31 jul. 2003.

LEE, W. M. Acetaminophen and the U.S. acute liver failure study group: Lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 6–9, 1 jul. 2004.

LEE, W. M. Drug-induced Acute Liver Failure. **Clinics in liver disease**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 575–86, viii, nov. 2013.

LEE, Y. A.; WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story. **Gut**, London, v. 64, n. 5, p. 830–841, 9 abr. 2015.

LEI, N. *et al.* Effects of low molecular weight yeast β -glucan on antioxidant and immunological activities in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 9, p. 21575–21590, 8 set. 2015.

LI, Y. Z. *et al.* Protective effects of extracts of *Schisandra chinensis* stems against acetaminophen-induced hepatotoxicity via regulation of MAPK and caspase-3 signaling pathways. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Nanjing, v. 16, n. 9, p. 700–713, 1 set. 2018.

LIM, J. *et al.* Antiobesity Effect of Exopolysaccharides Isolated from Kefir Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 65, n. 46, p. 10011–10019, 22 nov. 2017.

LV, Y. *et al.* Protective effect of naringenin against acetaminophen-induced acute liver injury in metallothionein (MT)-null mice. **Food and Function**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 297–302, fev. 2013.

MACKENZIE, P. I. *et al.* The novel UDP glycosyltransferase 3A2: cloning, catalytic properties, and tissue distribution. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 472–8, 1 mar. 2011.

MAHATTANATAWEE, K. *et al.* Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 19, p. 7355–7363, 20 set. 2006.

MAJOR, J. M. *et al.* Trends in rates of acetaminophen-related adverse events in the United States. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 590–8, 2016.

MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, J. Dengue viral infections. **Postgrad**

Med J, London, v. 80, p. 588–601, 2004.

MANA R. EHLERS; REBECCA M. TODD. Genesis and Maintenance of Attentional Biases: The Role of the Locus Coeruleus-Noradrenaline System. **Neural Plasticity**, New York, v. 1, n. 1, p. 2–3, 2017.

MARRA, F.; LOTERSZTAJN, S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 19, n. 29, p. 5250–69, 2013.

MAST, C.; DARDEVET, D.; PAPET, I. Impact of medication on protein and amino acid metabolism in the elderly: the sulfur amino acid and paracetamol case. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 179–192, 20 dez. 2018.

MASUBUCHI, Y.; SUDA, C.; HORIE, T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 110–116, jan. 2005.

MCDONAGH, S. T. J. *et al.* Potential benefits of dietary nitrate ingestion in healthy and clinical populations: A brief review. **European Journal of Sport Science**, Abingdon, v. 19, n. 1, p. 15–29, 2 jan. 2019.

MELO, F. S. P.; MAIA, M.; MEIRELLES, A. Hepatite por drogas. In: BITTENCOURT, L. P.; ZOLLINGER, C. C.; LOPES, E. P. DE A. (Eds.). **Manual de cuidados intensivos em hepatologia**. 2. ed. Barueri: Manole, 2017. p. 550.

MERT, H. *et al.* Investigation of the Protective Effect of Kefir against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats. **Korean journal for food science of animal resources**, Seoul, v. 38, n. 2, p. 259–272, abr. 2018.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 247, n. 10, p. 3170–5, 25 maio 1972.

MIYAMOTO, J. *et al.* Barley β -glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 4, p. e0196579, 1 abr. 2018.

MOSEDALE, M.; WATKINS, P. B. Drug-induced liver injury: Advances in mechanistic understanding that will inform risk management. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 101, n. 4, p. 469–480, 1 abr. 2017.

MULLER, F. L. *et al.* Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 40, n. 11, p. 1993–2004, 1 jun. 2006.

MUTHURAMALINGAM, K. *et al.* Effect of mushroom (*Schizophyllum* spp.) derived β -glucan on low-fiber diet induced gut dysbiosis. **Journal of Applied Biological Chemistry**, Seoul, v. 62, p. 211–217, 2019.

O'GRADY, J. G. *et al.* Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure.

Gastroenterology, Baltimore, v. 97, n. 2, p. 439–445, ago. 1989.

OLSON, J. C. Acute-on-chronic and Decompensated Chronic Liver Failure. **Critical Care Clinics**, Philadelphia, v. 32, n. 3, p. 301–309, 1 jul. 2016.

PAPACKOVA, Z. *et al.* Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. 01-20, 1 jan. 2018.

PELLICORO, A. *et al.* Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 14, n. 03, p. 181-194, mar. 2014.

PETERSON, R. G.; RUMACK, B. H. Treating acute acetaminophen poisoning with acetylcysteine. **JAMA**, Chicago, v. 237, n. 22, p. 2406–7, 30 maio 1977.

PRESCOTT, L. F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **J. clin. Pharmac**, London, v. 10, p. 291–298, 1980.

PUNARO, G. R. *et al.* Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, San Diego, v. 37, p. 53–60, 15 fev. 2014.

QIU, Y.; BENET, L. Z.; BURLINGAME, A. L. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 28, p. 17940–17953, 10 jul. 1998.

QIU, Y.; BENET, L. Z.; BURLINGAME, A. L. Identification of Hepatic Protein Targets of the Reactive Metabolites of the Non-hepatotoxic Regioisomer of Acetaminophen, 3'-Hydroxyacetanilide, in the Mouse in Vivo Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Advances in experimental medicine and biology**, New York, v. 500, p. 663–673, 2001.

RAJARAM, P.; SUBRAMANIAN, R. Acute Liver Failure. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, New York, v. 39, n. 5, p. 513–522, 1 out. 2018.

RAO, R. *et al.* Interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells promote hepatic regeneration in mice. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 147, n. 2, p. 473-484, 2014.

REVERBERI, M. *et al.* Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 2, p. 207–215, nov. 2005.

RODERFELD, M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 68–69, p. 452–462, 1 ago. 2018.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive Physiology**, Bethesda, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.

SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. **Molecular Nutrition and Food**

Research, Weinheim, v. 58, n. 01, p. 183-193, jan. 2014.

SANDILANDS, E. A.; BATEMAN, D. N. Adverse reactions associated with acetylcysteine. Adverse reactions associated with acetylcysteine E.A. Sandilands and D.N. bateman. **Clinical Toxicology**, London, v. 47, n. 02, p. 81-88, 2009.

SENIOR, J. R. Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 92, n. 3, p. 332–339, set. 2012.

SHIFFMAN, S. *et al.* Exceeding the maximum daily dose of acetaminophen with use of different single-ingredient OTC formulations. **Journal of the American Pharmacists Association**, New York, v. 58, n. 5, p. 499–504, 1 set. 2018.

SHIVA, S. *et al.* Nitroxia: The pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 38, n. 3, p. 297–306, 1 fev. 2005.

SHWARTZ, A.; GOESSLING, W.; YIN, C. Macrophages in Zebrafish Models of Liver Diseases. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, p. 01-12, 4 dez. 2019.

SI-TAYEB, K.; LEMAIGRE, F. P.; DUNCAN, S. A. Organogenesis and Development of the Liver. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 18, n. 02, p. 175-189, 16 fev. 2010.

SIMA, P.; VANNUCCI, L.; VETVICKA, V. β -glucans and cholesterol (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 41, n. 4, p. 1799–1808, 1 abr. 2018.

SLAMEŇOVÁ, D. *et al.* Protective effects of fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 198, n. 2, p. 153–160, 2003.

SOFI, SA; SINGH, J. R. S. β -Glucan and Functionality: A Review. **EC Nutrition**, London, p. 67–74, 2017.

SOLEIMANI, V. *et al.* Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. **Phytotherapy Research**, London, v. 33, n. 6, p. 1627–1638, 8 jun. 2019.

STANGER, B. Z. Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 77, n. 1, p. 179–200, 10 fev. 2015.

STEINHORN, R. H.; LAKSHMINRUSIMHA, S. Oxygen and pulmonary vasodilation: The role of oxidative and nitrosative stress. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 101083, 1 abr. 2020.

STINE, J. G.; LEWIS, J. H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: A systematic review. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, Abingdon, v. 10, n. 04, p. 517-536, 2 abr. 2016.

STRAVITZ, R. T.; LEE, W. M. Acute liver failure. **The Lancet**, London, v. 394, n. 10201, p. 869–881, 7 set. 2019.

SUN, K. *et al.* Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: Distinct diseases, different choices. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 1, p. 6494, 29 maio 2015.

SUN, S. S. *et al.* An insoluble polysaccharide from the sclerotium of *Poria cocos* improves hyperglycemia, hyperlipidemia and hepatic steatosis in ob/ob mice via modulation of gut microbiota. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Beijing, v. 17, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2019.

SURAI, P. F. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. **Antioxidants**, Basel, v. 4, n. 1, p. 204–247, 1 mar. 2015.

TALEB, A. *et al.* Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 102, p. 689–698, jun. 2018.

TIEN, Y. H. *et al.* Hepatoprotective and anti-oxidant activities of *glossogyne tenuifolia* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **American Journal of Chinese Medicine**, Singapore, v. 42, n. 6, p. 1385–1398, 16 maio 2014.

TIWARI, U. P.; SINGH, A. K.; JHA, R. Fermentation characteristics of resistant starch, arabinoxylan, and β -glucan and their effects on the gut microbial ecology of pigs: A review. **Animal Nutrition**, Beijing, v. 5, n. 3, p. 217–226, 1 set. 2019.

TOKLU, H. Z. *et al.* Acetaminophen-induced toxicity is prevented by β -d-glucan treatment in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 543, n. 1–3, p. 133–140, 14 ago. 2006.

TOMLINSON, L. *et al.* In vitro Liver Zonation of Primary Rat Hepatocytes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 7, 18 fev. 2019.

VAUTIER, S.; MACCALLUM, D. M.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. **Cytokine**, Oxford, v. 58, n. 01, p. 89–99, abr. 2012.

VERNON, H.; KASI, A. **Anatomy, Abdomen and Pelvis, Liver**. [S. l.]: StatPearls Publishing, 2019.

VETVICKA, V. Effects of β -glucan on some environmental toxins: An overview. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, Czechoslovakia, v. 158, n. 1, p. 1–4, 1 abr. 2014.

WANG, Q. *et al.* Antioxidant activity of carboxymethyl (1→3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 69, p. 229–235, ago. 2014.

WILCZAK, J. *et al.* The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. **Food and Function**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 590–603, 1 fev. 2015.

WISSE, E. *et al.* Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. **Toxicologic**

pathology, Newark, v. 24, n. 1, p. 100–11, 2 jan. 1996.

WU, J.; ZERN, M. A. Hepatic stellate cells: A target for the treatment of liver fibrosis. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 35, n. 09, p. 665-672, 2000.

XU, H. *et al.* Anti-Tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 01-13, 29 jun. 2016.

XU, X. Y. *et al.* Improved protective effects of American ginseng berry against acetaminophen-induced liver toxicity through TNF- α -mediated caspase-3/-8/-9 signaling pathways. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 51, p. 128–138, 2018.

YAN, M. *et al.* Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 17, p. 274, 2018.

YAREMA, M. *et al.* Anaphylactoid Reactions to Intravenous N-Acetylcysteine during Treatment for Acetaminophen Poisoning. **Journal of Medical Toxicology**, Philadelphia, v. 14, n. 2, p. 120–127, 1 jun. 2018.

ZAHER, H. *et al.* Protection against Acetaminophen Toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 Double-Null Mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 152, n. 1, p. 193–199, set. 1998.

ZYŁA, E. *et al.* Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 19, p. 01-22, 5 out. 2019.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL

**EFEITOS DA β -GLUCANA OBTIDA DO KEFIR NA LESÃO
HEPÁTICA INDUZIDA POR ACETAMINOFENO EM
CAMUNDONGOS**

Efeito hepatoprotetor da β -glucana

**EFFECTS OF β -GLUCAN OBTAINED FROM KEFIR ON
ACETAMINOPHEN-INDUCED LIVER INJURY IN MICE**

Carla Mirele Tabósa Quixabeira¹

Eduardo Carvalho Lira ²

¹Mestranda em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica -UFPE-CAV;
Pós-Graduada em Nutrição Clínica, Universidade Gama Filho (UGF), PE e Pós-
Graduada em Nutrição Esportiva, Centro Universitário do Vale do Ipojuca- UNIFAVIP
– DEVRVY | Caruaru-PE | Brasil | E-mail: carlatabosa2009@hotmail.com

² Bacharel Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba; Mestre em
Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Doutor
em Fisiologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP USP).
Professor adjunto da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

EFEITOS DA B-GLUCANA OBTIDA DO KEFIR NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS

Carla Mirele Tabósa Quixabeira

Eduardo Carvalho Lira

Resumo

O acetaminofeno (APAP, paracetamol) é um dos analgésicos e antipiréticos mais utilizados no mundo. Ainda que terapêuticamente seguro, o uso abusivo e, normalmente não prescrito, pode ocasionar insuficiência hepática aguda (IHA), o que o torna uma grande preocupação na prática clínica. A metabolização de doses excessivas de APAP produz o N-acetyl-p-benzoquinona-imina (NAPQI) e depleção rápida da glutathione (GSH), provocando intenso estresse oxidativo, principal mecanismo envolvido ao desenvolvimento da necrose centrobular e IHA. O uso da n-acetilcisteína (NAC) é a única opção de tratamento da IHA induzida pelo APAP, mas, que tem seu uso limitado pelos efeitos adversos. Neste sentido, a busca por novos agentes terapêuticos se tornou uma necessidade para a prevenção e/ou tratamento da IHA. Intensificou-se o estudo de moléculas que possam atenuar o estresse oxidativo resultantes do metabolismo do APAP, entre os quais estão os exopolissacarídeos obtidos dos grãos de kefir. Estudos tem mostrado a utilização do kefir como agente antioxidante. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da β -glucana (BG) derivada do kefir na IHA induzida pelo APAP em camundongos. Camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss (30-40g) receberam BG ou salina 0,9%. Posteriormente, todos os animais, exceto o grupo controle (C), receberam uma dose única de APAP (250mg/kg, i.p.). 24 horas após a intoxicação por APAP, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e tecido para quantificação de marcadores de dano hepático. O APAP provocou insuficiência hepática aguda verificada através do aumento dos níveis dos indicadores avaliados, assim como provocou alterações histopatológica compatíveis à necrose centrolobular. A BG apresentou efeitos positivos sobre esses parâmetros.

Palavras-chave: Acetaminofeno. Insuficiência hepática aguda. Estresse oxidativo. Kefir.

EFFECTS OF B -GLUCAN OBTAINED FROM KEFIR ON ACETAMINOPHEN-INDUCED LIVER INJURY IN MICE

Carla Mirele Tabósa Quixabeira

Eduardo Carvalho Lira

Abstract

Acetaminophen (APAP, paracetamol) is one of the most widely used analgesics and antipyretics in the world. Although therapeutically safe, abusive and usually not prescribed use can cause acute liver failure (ALF), which makes it a major concern in clinical practice. The metabolization of excessive doses of APAP produces N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) and rapid glutathione depletion (GSH), causing intense oxidative stress, the main mechanism involved in the development of centrobular necrosis and ALF. The use of n-acetylcysteine (NAC) is the only treatment option for APAP-induced ALF, but its use is limited by adverse effects. In this sense, the search for new therapeutic agents has become a necessity for the prevention and/or treatment of ALF. The study of molecules that can attenuate oxidative stress resulting from APAP metabolism was intensified, among which are exopolysaccharides obtained from kefir grains. Studies have shown the use of kefir as an antioxidant agent. The aim of this study was to evaluate the effect of β -glucan (BG) derived from kefir in APAP-induced ALF in mice. Male mice (*Mus musculus*) of the Swiss strain (30-40g) received BG or saline 0.9%. Subsequently, all animals, except the control group (C), received a single dose of APAP (250mg/kg, i.p.). 24 hours after APAP poisoning, the animals were anesthetized to collect blood and tissue to quantify markers of liver damage. APAP caused acute liver failure by increasing the levels of the evaluated indicators, as well as caused histopathological changes compatible with centrolobular necrosis. BG had positive effects on these parameters.

Keywords: Acetaminophen. Acute liver failure. Oxidative stress. Kefir

INTRODUÇÃO

A insuficiência hepática aguda (IHA) tem como causa principal a lesão hepática induzida por medicamentos (LHIM) que é preocupante sobretudo pelo uso indiscriminado e/ou abusivo de diversos fármacos (1). De acordo com dados registrados entre 1998 e 2019 pelo Grupo de Estudos para Insuficiência Hepática Aguda de Adultos nos EUA, o uso abusivo do acetaminofeno (APAP, N-acetil-p-aminophenol), popularmente conhecido como paracetamol, corresponde a aproximadamente 50% dos casos (5). No Brasil, essa preocupação assume caráter ainda mais sério, sobretudo pela emergência das arboviroses como dengue, zika e chikungunya, já que os anti-inflamatórios não esteroidais são, na maioria das vezes, contraindicados nessas patologias (7).

Os efeitos deletérios do acetaminofeno no fígado devem-se às desordens nas vias de sua metabolização, pois, em doses terapêuticas, 10 a 15 % da metabolização do APAP acontece através de oxidação, na fase I do metabolismo hepático. Nesta, há a formação do metabólito tóxico N-acetyl-p-benzoquinona imina (NAPQI), o qual é conjugado a glutathione reduzida (GSH), levando a sua inativação e subsequente excreção (9). Entretanto, em altas concentrações de APAP, a formação excessiva de NAPQI gera uma rápida e importante depleção de GSH hepática (10). Logo, o NAPQI não conjugado a GSH forma adutos, ou seja, liga-se covalentemente aos grupos sulfidrilas de proteínas celulares, principalmente as localizadas nas mitocôndrias (11). Essa adução compromete a funcionalidade da cadeia transportadora de elétrons provocando aumento da produção de espécies

reativas de oxigênio (EROS) além de redução na capacidade de produção de adenosina trifosfato (ATP) e conseqüentemente morte celular (12).

Devido a relevância do estresse oxidativo mitocondrial na lesão hepática por APAP, intensificou-se o interesse pelo estudo de compostos que previnam ou diminuam a produção de EROS resultantes do metabolismo de altas doses desse medicamento (13).

Dentre os probióticos, destaca-se o kefir, uma bebida fermentada de origem asiática preparada a partir de grãos de kefir adicionados ao leite ou a uma matriz de sacarose e água (14,15). Estudos têm demonstrado sua ação benéfica no sistema imunológico e atuação como fator antioxidante (16,17). Esses efeitos são atribuídos principalmente aos exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelos grãos de kefir, que são formados por um conjunto de organismos simbióticos (bactérias e leveduras) (18). Recentemente, foi identificado a presença de β -glucanas (BGs) como componente dos EPS dos grãos de kefir (19). As BGs, que também estão naturalmente presentes em plantas, fungos e bactérias, apresentam diferentes efeitos biológicos positivos, incluindo ações antioxidantes, imunomoduladoras, anticâncer e hepatoprotetoras (20–23); Deste modo, este trabalho pretende avaliar os efeitos da β -glucana extraída do Kefir na prevenção da IHA induzida pelo APAP em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da beta-glucana do Kefir

A beta-glucana obtida do kefir foi cedida pelo Laboratório de Biofísica Química da Universidade Federal de Pernambuco – *Campus* Recife e seu processo de extração encontra-se sob sigilo de patente.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss (30- 40g), entre 8 e 12 semanas de vida. Os animais foram mantidos sob condições padrões de biotério. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais de biotério foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (CEUA) com protocolo n°: 23076. 033864/2018-67.

Desenho experimental

Os animais foram distribuídos randomicamente em oito grupos com n= 5 a 10 cada: Controle (C); acetaminofeno (APAP); beta-glucana íntegra 100 mg/kg (BGI 100) e 200 mg/kg (BGI 200); beta-glucana hidrolisada 100 mg/kg (BHI 100) e 200 mg/kg (BHI 200); beta-glucana hidrolisada administrada agudamente 200mg/kg (BHA 200); silimarina 100 mg/kg (SIL 100).

Os animais do grupo controle e APAP receberam pré-tratamento por gavagem durante 7 dias, os demais grupos foram pré-tratados com BGI, BGH ou silimarina por igual período. No sétimo dia de pré-tratamento, foi induzida a lesão hepática aguda com acetaminofeno 250mg/kg, via intraperitoneal nos grupos

experimentais. No oitavo dia do experimento, os animais foram anestesiados com solução contendo cetamina (0,9 ml/kg) e xilazina (0,1ml/kg) de massa corporal (24).

Análise do perfil bioquímico

Foram analisadas as transaminases hepáticas ALT e AST, além de albumina e proteínas totais. Os testes bioquímicos foram feitos com kits da marca Labtest®. Foi seguido o protocolo do fabricante.

Análise dos marcadores de estresse oxidativo

O tecido hepático foi homogeneizado com adição de tampão tris-base 50 mM e antiproteases PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) e ortovanadato de sódio de concentração 1 mM. Após esse processo, foram centrifugados a 0°C em 3600 rpm durante 10 minutos. Do sobrenatante, foram coletadas alíquotas para as análises de superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT); para glutathione (GSH/GSSG) e nitrito. Também foram feitas análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ácido tiobarbitúrico (TBARS) – 200 µl e proteínas pelo método de Bradford (25).

Análise histopatológica:

Para análise histopatológica, 500mg de tecido hepático foram coletados para avaliação histopatológicas. O tecido foi fixado em solução de formalina e passaram por processo de diafanização. Posteriormente emblocados em parafina histológica e corados com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico (26).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Para a análise múltipla de dados foi feita a análise de variância de via única (ANOVA one way) ou de via dupla (ANOVA two way) dependendo do tipo de variáveis, seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal Wallis para não-paramétricos. Para análise de evolução de O nível de significância foi considerado maior ou igual a 95% (p<0,05). Para análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 7®.

RESULTADOS

Não foi observada alteração no ganho de massa corporal nos animais pré-tratados com a beta-glucana íntegra (BGI) extraída do kefir (Figura 1). O grupo pré-tratado com 100mg/kg e 200mg/kg da BG hidrolisada (BGH) aumentou de modo dose dependente o ganho ponderal em ~2X e ~4X, respectivamente.

O acetaminofeno (APAP) gerou, após 24h de exposição aguda, um aumento nos níveis nos níveis séricos da ALT e AST. Os animais pré-tratados com a BGI reduziram os níveis séricos da ALT sem alterações nos níveis da AST (Figura 2 A,B) em ambas as doses avaliadas. Os animais pré-tratados com 100mg/kg e 200mg/kg da BGH reduziram os níveis das transaminases hepáticas (~50%). Os animais tratados imediatamente antes a indução da lesão hepática aguda com a beta glucana hidrolisada (BGH) reduziram em 50% os níveis séricos de ambas as transaminases hepáticas (Figura 2 A, B). Estes efeitos foram similares ao pré-tratamento com a silimarina (SIL), produto natural isolado das sementes do *Silybum marianum* e utilizado no tratamento da lesão hepática aguda (27). O APAP reduziu os níveis plasmáticos de proteínas totais, o que foi melhorado nos grupos BGI 200 mg/kg (~30%) e BGH 100mg/kg (25%), sem efeitos para o grupo tratado com

200mg/kg de BGH. Curiosamente, o tratamento com a BHA não preveniu a redução dos níveis de proteínas totais (Tabela 1). A lesão hepática aguda induzida pelo APAP reduziu os níveis plasmáticos de albumina (1,43 vs 2,13 g/dl do controle), porém não houve alteração nos grupos BGI, BGH e BHA (Tabela 1).

O pré-tratamento com a beta-glucana íntegra manteve os valores de GSH sem alterações em relação ao controle e ao APAP. Curiosamente, houve uma diminuição da glutathiona reduzida em BGH 100, 200 e BHA 200 apresentando diferença estatística comparado a CTRL, APAP e BGI. Destaca-se que BGH 100 e BHA 200 apresentaram a maior variação de GSH comparado ao grupo sem pré-tratamento (Figura 5).

Como já era esperado, a enzima superóxido dismutase apresentou redução no grupo que recebeu apenas acetaminofeno quando comparado ao grupo controle. O pré-tratamento com beta-glucana íntegra atenuou esse efeito aumentando esses níveis em 130 % comparado ao APAP, chegando a valores próximos ao controle. Nota-se que a BGH 200 elevou esses valores, porém não alcançou relevância estatística (Figura 6 A). Sobre a atividade da catalase, percebe-se que não houve alteração importante em nenhum dos grupos estudados (Figura 6 B).

As análises histopatológicas mostram que o acetaminofeno causou necrose no tecido hepático comparado ao controle. O pré-tratamento com a beta-glucana atenuou esses efeitos (Figura 7).

DISCUSSÃO

O paracetamol (acetaminofeno, APAP) é amplamente utilizado na clínica por suas ações analgésicas, antipiréticas e fracamente anti-inflamatórias. As β -glucanas

tem recebido muita atenção por seus efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e antioxidantes (28), razões pelas quais avaliamos o efeito da beta-glucana (BG) derivada do kefir íntegra e hidrolisada na insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno em camundongos.

O tratamento com a BG íntegra (BGI) extraída do Kefir não alterou o ganho ponderal, tampouco a ingestão alimentar (dado não mostrado) dos animais pré-tratados por 7 dias (Figura 1), ao contrário da BG hidrolisada (BGH) que aumentou o ganho ponderal, de modo dose dependente, sem alterações de consumo alimentar. Gudi *et al.*, (2019) mostrou que a partir do 5º dia, animais com colite e tratados com a BG extraída de leveduras ganharam massa corporal. De modo oposto, animais obesos tratados com BG isolada do fungo *Schizophyllum* reduziu o ganho ponderal induzido por dieta rica em gorduras (30). Os efeitos da BG no ganho de massa corporal estão associados aos efeitos anti-inflamatórios da BG, como observado em camundongos submetidos à inflamações intestinais (29), assim como, a prevenção no excesso de ganho massa corporal em condições inflamatórias crônicas como a obesidade (30). Esses achados podem estar relacionados a melhora da microbiota intestinal, maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino, especialmente o butirato, e maior sensibilidade a hormônios anabólicos importantes como insulina (31), o que pode, pelo em parte, explicar o ganho ponderal no grupo pré-tratado com a BGH.

Os efeitos das BG podem variar de acordo com a sua origem e tamanho/massa molecular, solubilidade e grau de polimerização de glicose (33,34). Neste sentido, é razoável especular que a massa da molécula pode interferir nos efeitos sobre massa corporal, assim como a origem da BG e o estado de saúde do

indivíduo, haja vista, os trabalhos citados se referem a redução ou ganho de massa em animais portadores de doenças metabólicas e inflamatórias.

É bem descrito que o sítio de maior expressão da CYP2E1 é a região centrolobular, onde coincide com a maior produção de NAPQI e necrose hepática (35), portanto, a região de maior interesse para avaliação dos danos teciduais provocados pelo APAP. O tratamento por 10 dias com β -glucana isolada do fungo *Saccharomyces cerevisiae* atenuou as principais alterações histopatológicas em camundongos, embora a dilatação dos sinusóides hepáticos tenha persistido (36). O pré-tratamento por 7 dias com β -glucana extraída do fungo *Aureobasidium* sp. se mostrou eficiente na proteção hepática contra o APAP (37). Até onde conhecemos, este trabalho é inédito na avaliação do efeito hepatoprotetor da BG extraída do Kefir.

Como observado nas Figura 2 , o APAP, após 24h, elevou os níveis séricos da alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, o que reflete uma lesão hepática aguda semelhante à observada em diferentes estudos (36,37,39). As transaminases são marcadores plasmáticos de lesões hepáticas de diferentes etiologias, tais como hepatites virais, doenças autoimunes, desordens metabólicas assim como a doença de Addison e hipotireoidismo, abuso de álcool e medicamentos como o paracetamol (40,41).

O pré-tratamento com a BGI reduziu os níveis da ALT, enquanto a BGH reestabeleceu os níveis normais de ALT sérica em animais intoxicados, inclusive o grupo BGHA. O pré-tratamento com a BGI não exerceu efeitos sobre os níveis de AST (Figura 2 b). Toklu e tal (2006) relatou que a BG isolada de *S. cerevisiae* igualmente reduziu os níveis de ALT, sem efeitos importantes sobre os níveis de AST. Os efeitos da BGH sobre os níveis da ALT foram ainda mais potentes em

relação à silimarina, o que sugere que a BGH tem ações hepatoprotetoras importantes em lesões agudas em camundongos

É importante destacar que o tamanho da cadeia da BG parece ser importante para o efeito biológico avaliado, sobretudo para os efeitos de proteção do tecido hepático observados no grupo tratado com a BGH. Corrobora esta hipótese, o trabalho de Zyla *et al.*, (2019), que demonstrou que a BG de baixo peso molecular extraída da aveia apresenta uma redução do infiltrado linfocitário de caráter inflamatório no intestino de animais com colite. Além disso, que a BG hidrolisada e de baixo peso molecular parece apresentar efeito imunomodulador mais potente em virtude do aumento na proporção das ligações β 1-3, as quais são mais bem reconhecidas pelo receptor delectina do tipo 1. Este é o receptor mais bem caracterizado para o reconhecimento das BG, sobretudo as de ligação 1-3 (44). Esta proteína também tem papel importante na cascata que regula a regeneração hepática e na modulação de diferentes efeitos biológicas da BG (45,46).

Além disso, os níveis plasmáticos de albumina (ALB) e proteínas totais (PT) foram reduzidos pelo APAP (tabela 1) de modo semelhante ao observado em outros estudos (39,47). Os níveis de ALB e PT são índices igualmente importantes para avaliação clínica e experimental da função hepática (48). A BGI e a BGH na menor dose utilizada estimularam a síntese de proteínas totais no fígado, o que não foi observado no grupo BGH200 e BHA. Provavelmente, a BG estimule a síntese proteica no fígado, independentemente do tamanho da molécula, o que reforça a atividade protetora para o fígado desta BG. Os nossos dados sugerem que uma dose única não parece estimular agudamente a síntese hepática de proteínas, sendo necessário o pré-tratamento e/ou o uso continuado de BG.

Neste trabalho, os dados séricos relacionados à disfunção hepática parecem estar diretamente correlacionados ao estresse oxidativo constatado na redução dos níveis de GSH e da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), assim como a elevação dos níveis de LPO (malondialdeído, MDA) e nitrito (Figura 3 e 4) induzidos pelo APAP.

Somente a BGI atenuou o consumo excessivo de GSH em camundongos com IHA induzida pelo APAP (Figura 5). De outro modo, os níveis de MDA e nitrito foram intensamente reduzidos pela BG, independentemente do tamanho da molécula, inclusive no grupo tratado agudamente (BHA) resultados semelhantes a estes foram vistos nos estudos prévios (49,50). No entanto, o melhor desempenho da BGI contraria os achados de Lei *et al.*, (2015), que destaca que o polissacarídeo de menor peso molecular teria capacidade antioxidante mais elevada possivelmente devido a sua maior solubilidade e consequente permeabilidade nas células (51).

É necessário destacar que o efeito sobre a LPO e a formação de espécies reativas de nitrogênio foram mais evidentes na BGH, inclusive aguda. Consistente com estes dados, o estímulo da atividade da SOD foi observado no pré (BGI e BGH) e no tratamento agudo com a BHA. Sendo assim, nossos dados sugerem que a BG atenua a hepatotoxicidade induzida pelo APAP provavelmente por reduzir os níveis de estresse oxidativo e LPO. Os efeitos antioxidantes da BG, semelhantes ao encontrados neste trabalho, tem sido descrito na literatura em modelos de IHA induzida por APAP (36), mas também em outras condições clinicamente importantes como doença intestinal inflamatória (49) e câncer de pulmão (52), o que corrobora a ação antioxidante e hepatoprotetora da BG extraída do kefir.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a β -glucana extraída do kefir parece proteger o tecido hepático contra a insuficiência hepática aguda induzida pelo acetaminofeno em camundongos, sobretudo por ações antioxidantes.

A BG hidrolisada indica ter maior eficiência na preservação morfofuncional do parênquima hepático o que reforça a importância de uso de BG de baixo peso molecular. Neste sentido, sugerimos que o uso da BG isolada do kefir pode representar uma estratégia na prevenção e/ou na redução dos danos hepáticos causados pelo uso abusivo do APAP e outros medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tujios SR, Lee WM. Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs: Challenges in diagnosis and therapy. *Liver Int* [Internet]. 1 de janeiro de 2018 [citado 11 de fevereiro de 2020];38(1):6–14. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13535>
2. Kuehn BM. FDA focuses on drugs and liver damage: Labeling and other changes for acetaminophen [Internet]. Vol. 302, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2009 [citado 12 de fevereiro de 2020]. p. 369–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622807>
3. Kuna L, Bozic I, Kizivat T, Bojanic K, Mrso M, Kralj E, *et al.* Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Curr Drug Metab*. 23 de maio de 2018;19(10):830–8.
4. Stine JG, Lewis JH. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: A systematic review. Vol. 10, *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 517–36.
5. Stravitz RT, Lee WM. Acute liver failure. Vol. 394, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 869–81.
6. Bernal W, Hyrylainen A, Gera A, Audimoolam VK, McPhail MJW, Auzinger G, *et al.* Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients. *J Hepatol*. 1 de julho de 2013;59(1):74–80.

7. Malavige GN, Fernando S, Fernando J. Dengue viral infections. *Postgr Med J* [Internet]. 2004 [citado 15 de julho de 2019];80:588–601. Available at: www.postgradmedj.com
8. Pandejpong D, Saengsuri P, Rattarittamrong R, Rujipattanakul T, Chouriyagune C. Is excessive acetaminophen intake associated with transaminitis in adult patients with dengue fever? *Intern Med J* [Internet]. 1 de junho de 2015 [citado 15 de julho de 2019];45(6):653–8. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/imj.12756>
9. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2010 [citado 9 de julho de 2019];(196):369–405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020268>
10. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicol Sci* [Internet]. 1 de fevereiro de 2002 [citado 9 de julho de 2019];65(2):166–76. Available at: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/65.2.166>
11. Cohen SD, Pumford NR, Khairallah EA, Boekelheide K, Pohl LR, Amouzadeh HR, *et al.* Selective Protein Covalent Binding and Target Organ Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 1 de março de 1997 [citado 14 de julho de 2019];143(1):1–12. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X96980746?via%3Dihub>
12. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of

- JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-induced Liver Injury. *J Biol Chem* [Internet]. 16 de maio de 2008 [citado 14 de julho de 2019];283(20):13565–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337250>
13. Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol* [Internet]. 2016 [citado 14 de julho de 2019];10:148–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>
 14. Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF. The microbial diversity of water kefir. 2011 [citado 18 de julho de 2019]; Available at: https://www2.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/A_diversidade_microbiana_do_kefir_de_água.pdf
 15. Farnworth ER. Handbook of fermented functional foods. *Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition*. 2008. 1–581 p.
 16. Franco MC, Golowczyc MA, De Antoni GL, Perez PF, Humen M, Serradell M d. I. A. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J Med Microbiol* [Internet]. 1 de dezembro de 2013 [citado 18 de julho de 2019];62(Pt_12):1815–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24072759>
 17. Mert H, Yılmaz H, Irak K, Yıldırım S, Mert N. Investigation of the Protective Effect of Kefir against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats. *Korean J food Sci Anim Resour* [Internet]. abril de 2018 [citado 18 de julho de 2019];38(2):259–72. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29805276>

18. Lim J, Kale M, Kim DH, Kim HS, Chon JW, Seo KH, *et al.* Antiobesity Effect of Exopolysaccharides Isolated from Kefir Grains. *J Agric Food Chem* [Internet]. 22 de novembro de 2017 [citado 16 de julho de 2019];65(46):10011–9. Available at: <https://hanyang.elsevierpure.com/en/publications/antiobesity-effect-of-exopolysaccharides-isolated-from-kefir-grai>
19. Hong JY, Lee NK, Yi SH, Hong SP, Paik HD. Short communication: Physicochemical features and microbial community of milk kefir using a potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* KU200284. *J Dairy Sci.* 1 de dezembro de 2019;102(12):10845–9.
20. Chen P, Wang Z, Zeng L, Yang X, Wang S, Dong W, *et al.* A novel soluble beta-glucan salectan protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(10):1990–3.
21. Wang Q, Chen S, Han L, Lian M, Wen Z, Jiayinaguli T, *et al.* Antioxidant activity of carboxymethyl (1→3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). *Int J Biol Macromol* [Internet]. agosto de 2014 [citado 1 de outubro de 2019];69:229–35. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014003341>
22. Vetvicka V. Effects of β -glucan on some environmental toxins: An overview. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* [Internet]. 1 de abril de 2014 [citado 1 de outubro de 2019];158(1):1–4. Available at: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2013.090.html>
23. Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Tecelioğlu M, Başak N. Beneficial effects of β -glucan

- against cisplatin side effects on the nervous system in rats 1. *Acta Cir Bras* [Internet]. março de 2016 [citado 1 de outubro de 2019];31(3):198–205. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502016000300198&lng=en&tlng=en
24. FISH, E.R., BROWN, M.J., DANNEMAN, P.J, KARAS A., organizador. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* [Internet]. 2º ed. Oxford: Elsevier; 2008 [citado 19 de julho de 2019]. Available at: <http://books.elsevier.com/aclam>
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7 de maio de 1976;72(1–2):248–54.
26. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al*. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 1 de junho de 2005 [citado 16 de julho de 2019];41(6):1313–21. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20701>
27. Soleimani V, Delghandi PS, Moallem SA, Karimi G. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. *Phyther Res* [Internet]. 8 de junho de 2019 [citado 10 de fevereiro de 2020];33(6):1627–38. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.6361>
28. Xu H, Zou S, Xu X, Zhang L. Anti-Tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. *Sci Rep*. 29 de junho de 2016;6.
29. Gudi R, Suber J, Brown R, Johnson BM, Vasu C. Pretreatment with Yeast-

- Derived Complex Dietary Polysaccharides Suppresses Gut Inflammation, Alters the Microbiota Composition, and Increases Immune Regulatory Short-Chain Fatty Acid Production in C57BL/6 Mice. *J Nutr* [Internet]. 27 de dezembro de 2019 [citado 19 de fevereiro de 2020]; Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31879786>
30. Muthuramalingam K, Singh V, Choi C, Choi S, Park S, Kim Y, *et al.* Effect of mushroom (*Schizophyllum* spp.) derived β -glucan on low-fiber diet induced gut dysbiosis. *J Appl Biol Chem*. 2019;62:211–7.
31. Miyamoto J, Watanabe K, Taira S, Kasubuchi M, Li X, Irie J, *et al.* Barley β -glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice. *PLoS One* [Internet]. 1 de abril de 2018 [citado 19 de fevereiro de 2020];13(4):e0196579. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29698465>
32. Bae IY, Lee S, Kim SM, Lee HG. Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice. *Food Hydrocoll* [Internet]. outubro de 2009 [citado 26 de janeiro de 2020];23(7):2016–21. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09000733>
33. SUN SS, WANG K, MA K, BAO L, LIU HW. An insoluble polysaccharide from the sclerotium of *Poria cocos* improves hyperglycemia, hyperlipidemia and hepatic steatosis in ob/ob mice via modulation of gut microbiota. *Chin J Nat Med*. 1 de janeiro de 2019;17(1):3–14.
34. Aizawa M, Watanabe K, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Grundler FMW, *et al.* Low molecular-weight curdlan, (1→3)- β -glucan suppresses TLR2-induced

- RANKL-dependent bone resorption. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2018 [citado 19 de fevereiro de 2020];41(8):1119–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30068878>
35. Larson AM. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* [Internet]. 1 de agosto de 2007 [citado 16 de julho de 2019];11(3):525–48. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1089326107000499?via%3Dihub>
36. Toklu HZ, Şehirli AÖ, Velioğlu-Öğünç A, Çetinel Ş, Şener G. Acetaminophen-induced toxicity is prevented by β -d-glucan treatment in mice. *Eur J Pharmacol*. 14 de agosto de 2006;543(1–3):133–40.
37. Lee JW, Byun EH, Sung NY, Raghavendran HRB, Byun EB, Kim JH, *et al.* Effect of gamma irradiation on the efficacy of β -glucan against acetaminophen induced toxicity in mice. *Chem Biol Interact* [Internet]. 15 de junho de 2009 [citado 19 de fevereiro de 2020];180(1):98–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109935>
38. Chen P, Wang Z, Zeng L, Wang S, Dong W, Jia A, *et al.* Protective effects of salean against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Appl Toxicol* [Internet]. outubro de 2012 [citado 1 de outubro de 2019];32(10):796–803. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1694>
39. Hasanein P, Sharifi M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male wistar rats. *Pharm Biol* [Internet]. 25 de maio de 2017 [citado 19 de fevereiro de 2020];55(1):1809–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28545313>

40. Dong V, Nanchal R, Karvellas CJ. Pathophysiology of Acute Liver Failure. *Nutr Clin Pract* [Internet]. 1 de fevereiro de 2020 [citado 19 de fevereiro de 2020];35(1):24–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ncp.10459>
41. Senior JR. Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther.* setembro de 2012;92(3):332–9.
42. LI YZ, Zhi-Na M, SUN YS, REN S, JIANG S, ZHANG WZ, *et al.* Protective effects of extracts of *Schisandra chinensis* stems against acetaminophen-induced hepatotoxicity via regulation of MAPK and caspase-3 signaling pathways. *Chin J Nat Med.* 1 de setembro de 2018;16(9):700–13.
43. Zyla E, Dziendzikowska K, Gajewska M, Wilczak J, Harasym J, Gromadzka-Ostrowska J. Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight. *Molecules.* 5 de outubro de 2019;24(19).
44. Fesel PH, Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 1 de maio de 2016 [citado 19 de fevereiro de 2020];90:53–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26688467>
45. Vautier S, MacCallum DM, Brown GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. Vol. 58, *Cytokine.* 2012. p. 89–99.
46. Rao R, Graffeo CS, Gulati R, Jamal M, Narayan S, Zambirinis CP, *et al.* Interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells promote hepatic regeneration in mice. *Gastroenterology.* 2014;147(2).

47. Gao S, Silasi-Mansat R, Behar AR, Lupu F, Griffin CT. Excessive Plasmin Compromises Hepatic Sinusoidal Vascular Integrity After Acetaminophen Overdose. *Hepatology*. 1 de novembro de 2018;68(5):1991–2003.
48. Ihegboro GO, Ononamadu CJ, Afor E, Odogiyan GD. Cytotoxic and Hepatocurative Effect of Aqueous Fraction of *Tapinanthus bangwensis* Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. *J Evidence-Based Integr Med*. 26 de setembro de 2018;23.
49. Wilczak J, Błaszczuk K, Kamola D, Gajewska M, Harasym JP, Jałosińska M, *et al*. The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. *Food Funct*. 1 de fevereiro de 2015;6(2):590–603.
50. Tien YH, Chen BH, Wang Hsu GS, Lin WT, Huang JH, Lu YF. Hepatoprotective and anti-oxidant activities of *glossogyne tenuifolia* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Am J Chin Med*. 16 de maio de 2014;42(6):1385–98.
51. Lei N, Wang M, Zhang L, Xiao S, Fei CZ, Wang X, *et al*. Effects of low molecular weight yeast β -glucan on antioxidant and immunological activities in mice. *Int J Mol Sci*. 8 de setembro de 2015;16(9):21575–90.
52. Choromanska A, Kulbacka J, Harasym J, Oledzki R, Szewczyk A, Saczko J. High- and low-Molecular Weight oat Beta-Glucan Reveals Antitumor Activity in Human Epithelial Lung Cancer. *Pathol Oncol Res [Internet]*. 1 de julho de 2018 [citado 19 de fevereiro de 2020];24(3):583–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28756506>

Tabela 1- Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de proteínas totais (PTN) e albumina (ALB) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP. * $p < 0,05$ versus APAP; ** $p < 0,05$ versus BGI. $n = 5$ a 10 . CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina; Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA ONE WAY Pós-teste: Tukey. # $p < 0,05$ versus CTRL;

	CTRL	APAP 250	BGI 100	BGI 200	BGH 100	BGH 200	BHA 200	SIL 100
Proteínas totais	5,82 \pm 0,36	4,53 \pm 0,08 [#]	5,52 \pm 0,19 [*]	5,84 \pm 0,13 [*]	5,65 \pm 0,06 [*]	4,98 \pm 0,23	4,19 \pm 0,42 ^{# **}	6,09 \pm 0,09 ^{* **}
Albumina	2,13 \pm 0,34	1,43 \pm 0,07 [#]	1,56 \pm 0,11	1,79 \pm 0,11	1,9 \pm 0,12	1,85 \pm 0,11	1,64 \pm 0,11	1,75 \pm 0,08

Fonte: Dados do estudo

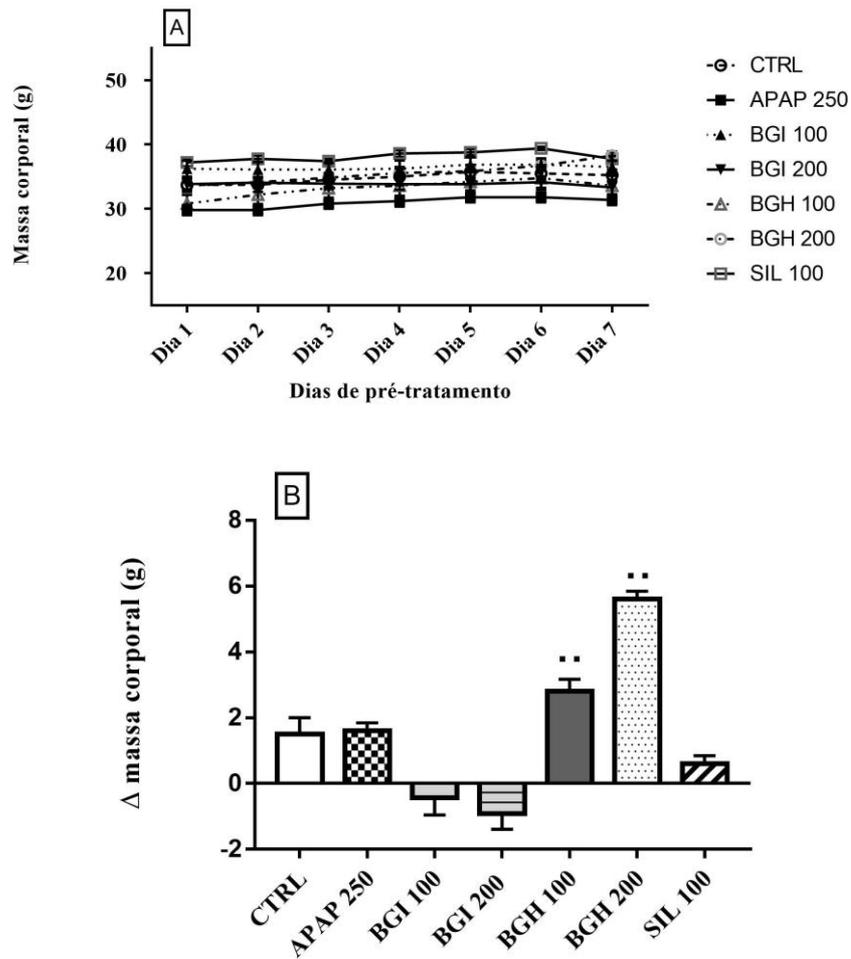


Figura 1 -Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β - glucana extraída do kefir na massa corporal total em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP). Δ = massa final – massa inicial. Dados expressos em média \pm EP. ** $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β - glucana íntegra; BGH: β - glucana hidrolisada; BHA: β - glucana hidrolisada dose única; SIL: Silimarina Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA TWO WAY (A) e ANOVA ONE WAY (B) Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

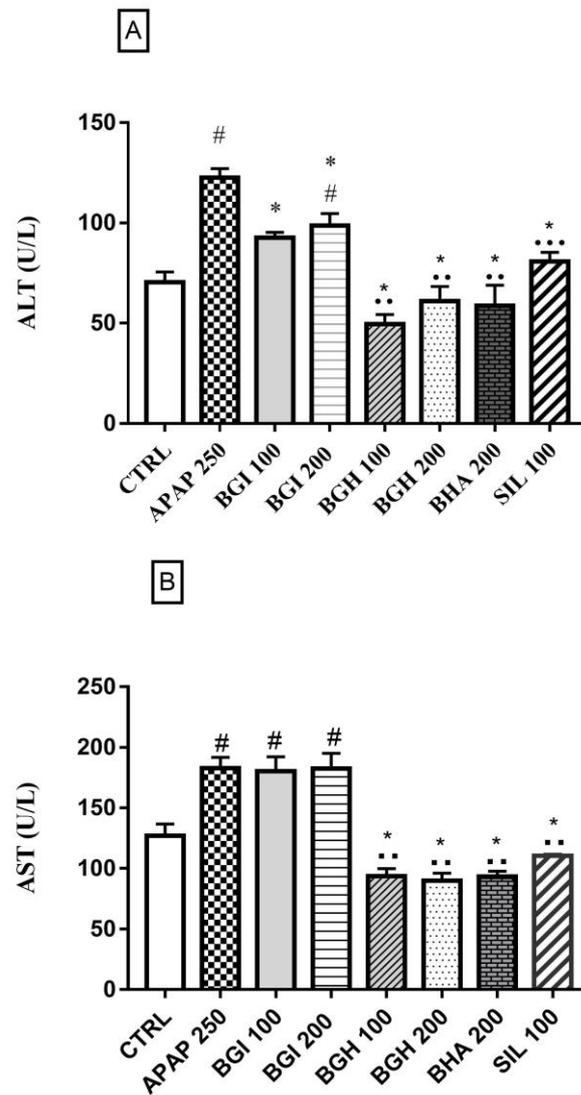


Figura 2 -Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT, A) e aspartato (AST, B) aminotransferases em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI; CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

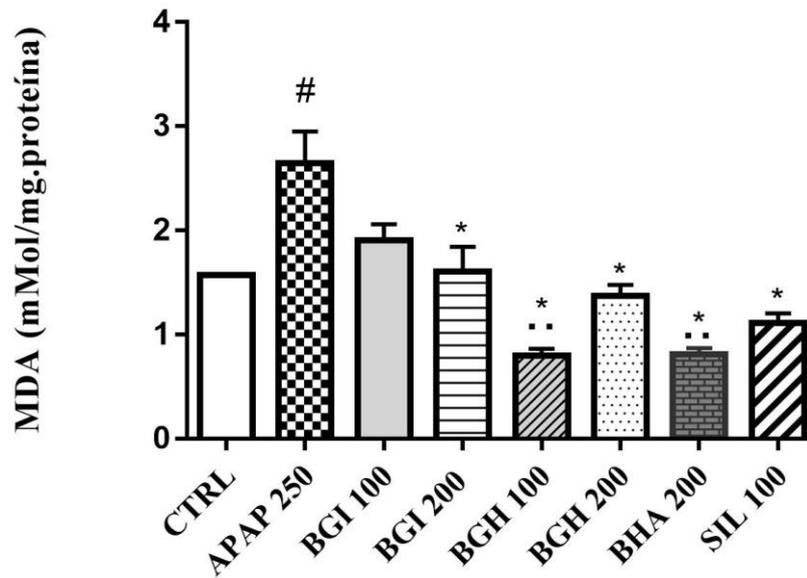


Figura 3 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI. APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada dose única. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

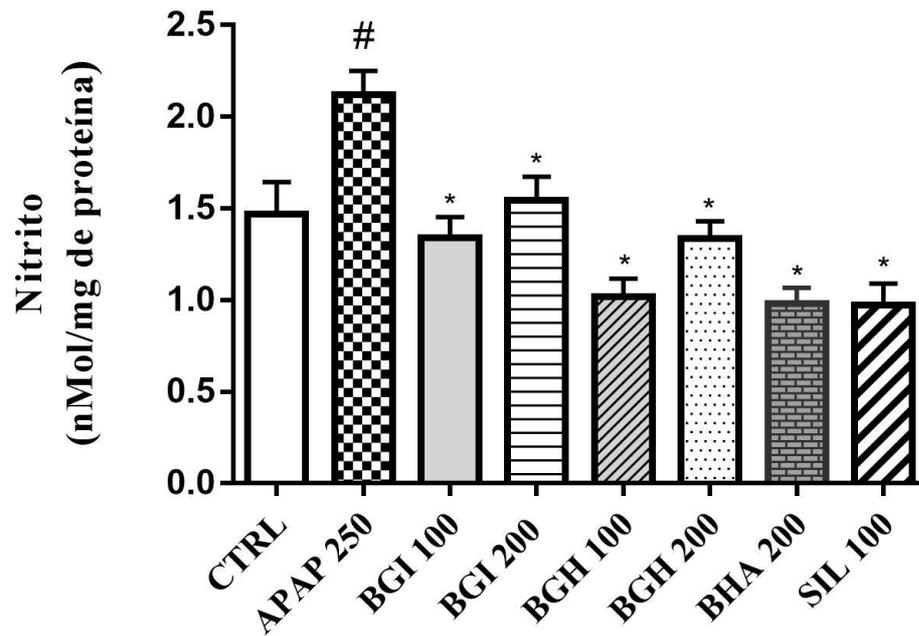


Figura 4 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de nitrito em camundongos com insuficiência hepática induzida pelo acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

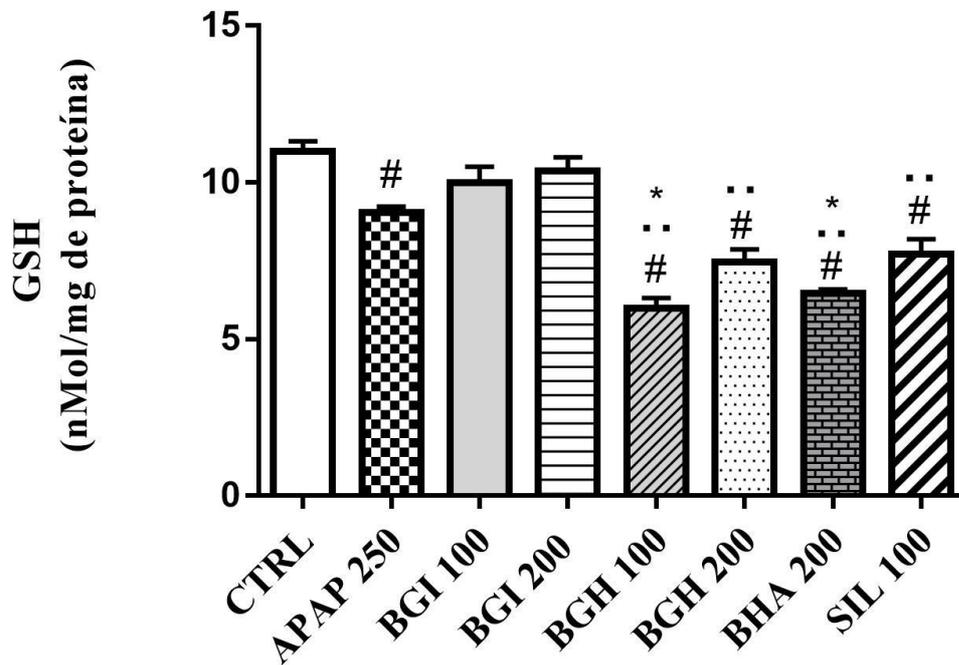


Figura 5 - Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com β -glucana extraída do kefir nos níveis hepáticos de glutathione (GSH) em camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP. #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10 .

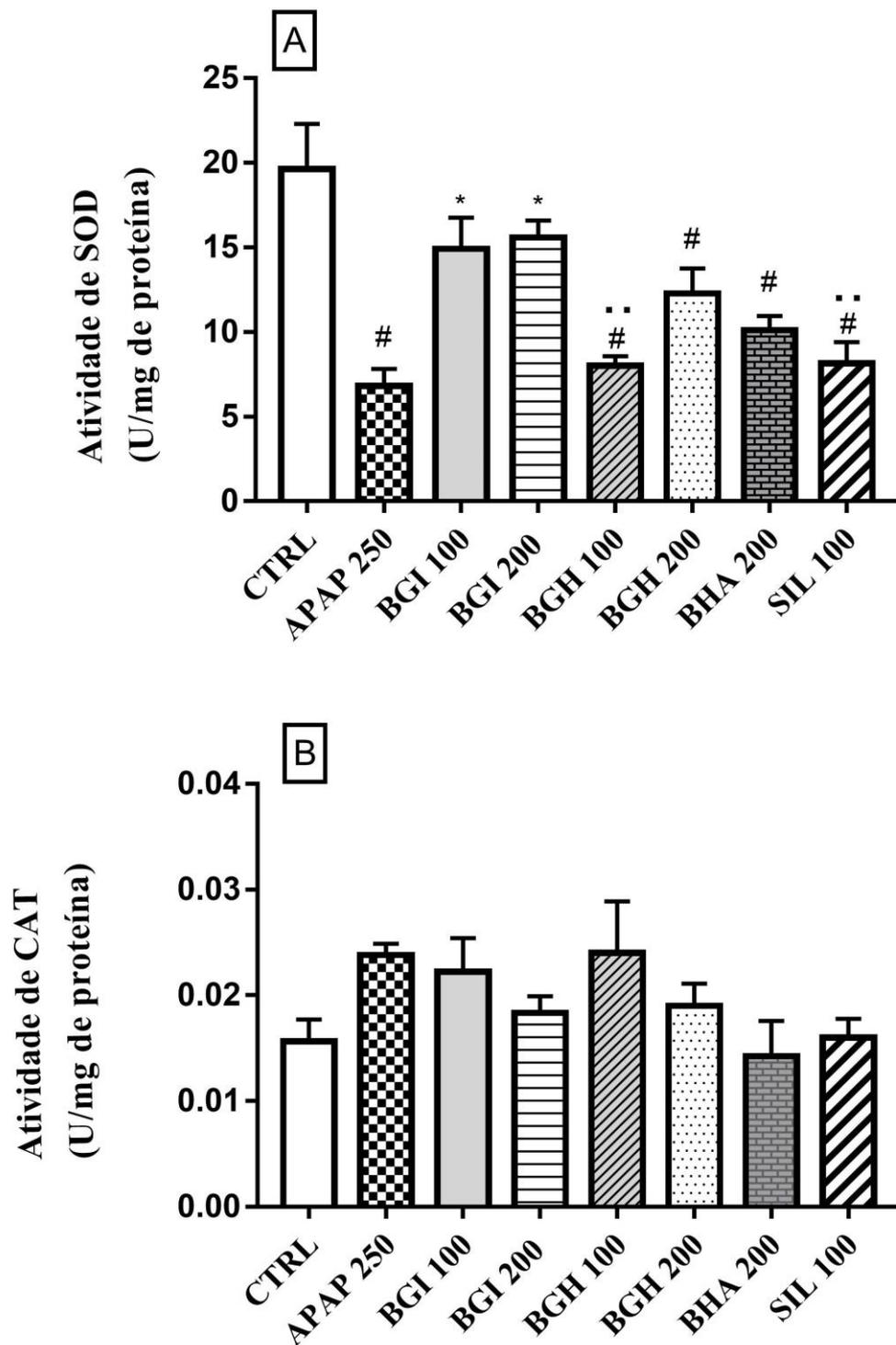


Figura 6- Efeito do pré-tratamento e do tratamento agudo com a β -glucana extraída do kefir na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD, A) e catalase (CAT, B) no fígado de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida pelo acetaminofeno (APAP). Dados expressos em média \pm EP; #: $p < 0,05$ versus Controle; *: $p < 0,05$ versus APAP; **: $p < 0,05$ versus BGI. CTRL: Controle; APAP: acetaminofeno; BGI: β -glucana íntegra; BGH: β -glucana hidrolisada; BHA: β -glucana hidrolisada tratamento agudo; SIL: Silimarina. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk; ANOVA one way; Pós-teste: Tukey. $n = 5$ a 10.

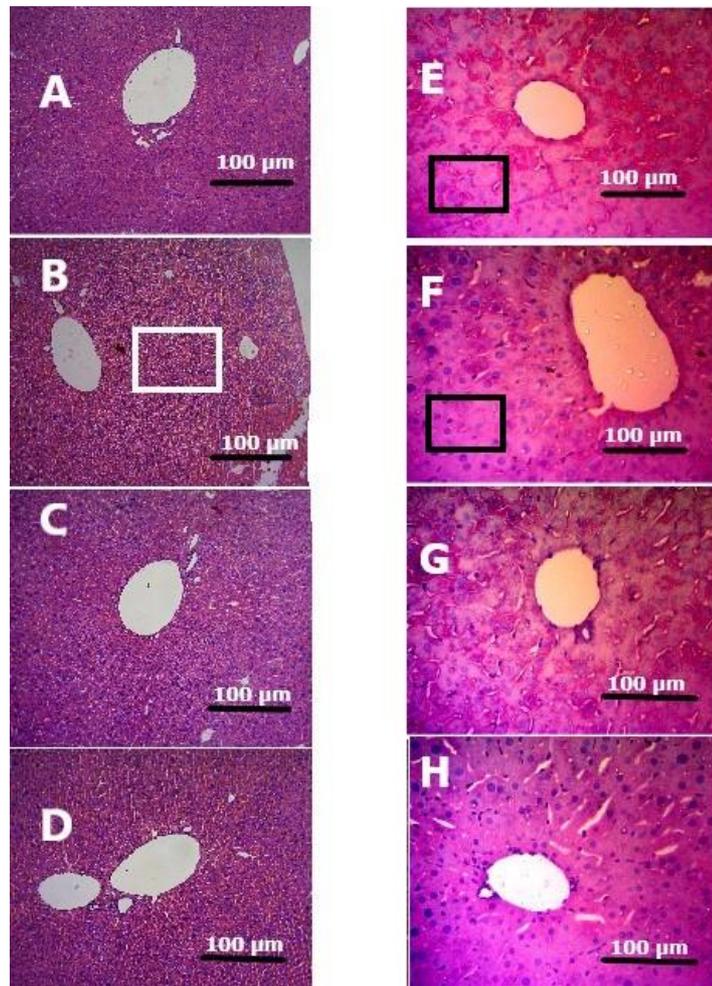


Figura 7- Efeito do pré-tratamento com β -glucana do kefir na morfologia hepática de camundongos com insuficiência hepática aguda (IHA) induzida por acetaminofeno (APAP). Área delimitada por retângulo branco: desestruturação do parênquima hepático, ingurgitação dos sinusoides e presença de vacuolização. Área delimitada por retângulos pretos: áreas do hepatócito com indícios de recuperação estrutural do parênquima após o pré-tratamento com a beta-glucana hidrolisada nas doses de 100 e 200 mg/kg respectivamente. A: Controle; B: Acetaminofeno; C: β -glucana íntegra 100 mg/kg; D: β -glucana íntegra 200 mg/kg; E: β -glucana hidrolisada 100 mg/kg; F: β -glucana hidrolisada 200 mg/kg; G: β -glucana dose aguda 200 mg/kg; H: Silimarina; VC: veia centrolobular. Coloração hematoxilina-eosina. Objetiva 10x e 40x da esquerda para direita.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de março de 2019

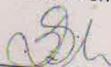
Ofício nº 12/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Eduardo Carvalho Lira**
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.033864/2018-67

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da β -glucana obtida do Kefir na lesão hepática induzida por acetaminofenoem camundongos," registrado com o nº 23076.033864/2018-67 sob a responsabilidade de **Prof. Eduardo Carvalho Lira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/03/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/05/2019 ate 12/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Camundongo
Nº de animais	48
Peso/Idade	30-40g/ 10 a 12 semanas
Sexo	Macho (48)
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO

Scope and Policy

The *Revista de Nutrição* (Brazilian Journal of Nutrition) (e-ISSN 1678-9865) is a specialized periodical that publishes articles that contribute to the study of Nutrition in its many sub-areas and interfaces. It is published bimonthly and open to contributions of the national and international scientific communities.

There is no fee for submission and review articles.

Submission

All articles must be submitted electronically at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo>.

Any other form of submission will not be accepted by the editors.

At the time of submission must be attached: (1) The article (complete file in Word format, including cover sheet, abstract, text, references and illustrations); (2) The illustrations (in editable file, in the formats accepted by the magazine); (3) All documentation required by the magazine (duly signed by all authors).

Submitted manuscripts may be rejected without detailed comments after initial review by at least two *Revista de Nutrição* (Brazilian Journal of Nutrition) editors if the manuscripts are considered inappropriate or of insufficient scientific priority for publication in the Journal.

The *Revista de Nutrição* (Brazilian Journal of Nutrition) does not publish more than 1 (one) article from the same author in the same year (volume) to avoid endogeneity. This procedure aims to increase the number of themes and collaborations made by national and foreign authors.

Open access policy

The Journal provides open access to all its content, which is protected by the Creative Commons license (CC-BY).

Research involving living beings

Results of research involving human beings and animals, must contain a copy of the Research Ethics Committee approval.

Registration of Clinical Trials

Articles with results of clinical researches must present an identification number in one of the Register of Clinical Trials validated by criteria established by the World Health Organization (WHO) and International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), whose addresses are available at the [ICMJE site](#). The identification number must be included at the end of the abstract.

Conflict of interest

Authors: The authors must declare explicitly and individually any potential, direct or indirect, financial or nonfinancial conflict of interest, etc., and any conflict of interest with *ad hoc* referees.

Ad hoc referees: If any of the referees declare a conflict of interest, the Editorial Board will send the manuscript to another *ad hoc* referee.

Plagiarism

All submitted articles will be screened using the plagiarism detection tool CrossCheck before the peer review process.

Social Networks

In order to increase its dissemination, the Revista de Nutrição (Brazilian Journal of Nutrition) asks the authors to disseminate their articles published at the SciELO site at the social networks below, among others:

Academia.edu – <https://www.academia.edu/>

Mendeley – <https://www.mendeley.com/>

ResearchGate – <http://www.researchgate.net/>

Google Scholar - <https://scholar.google.com.br/schhp?hl=pt-BR>

Referees

The authors may indicate three referees for assessing the manuscript and their respective e-mails and institutional affiliations. Alternatively, the authors may indicate three referees that should not assess their manuscript.

Manuscript Assessment Process

Original manuscripts will be accepted for review as long as they have not been submitted to any other journal in parallel and/or published previously to preserve the original character of the article. They should be accompanied by: a submission cover letter, a completed submission checklist, and all other documents listed in the item "Documents". **All documents must be signed**

by all authors.

All manuscripts will only start undergoing the publication process if they are in agreement with the Instructions to the Authors. If not, **they will be returned for the authors to make the appropriate adjustments**, include a letter or other documents that may be necessary. See item preparation of the manuscript.

Articles with any of the mistakes mentioned above **will be returned even before they are submitted to assessment** regarding the merit of the work and the convenience of its publication.

Pre-analysis: assessment is made by the Scientific Editors based on the originality, pertinence, academic quality, and relevance of the manuscript for the area of nutrition.

Manuscripts approved in this stage will be sent to ad hoc referees. Each manuscript will be sent to three referees of known competence in the theme. The authors may choose one of them. If there is disagreement, the manuscript will be sent to a fourth referee.

The peer review process used is the blind review, where the identity of the authors and the reviewers is not mutually known. Thus the authors must do everything possible to avoid the identification of the authors of the manuscript.

The opinions of the reviewers are one of the following: (a) approved; (b) new analysis needed; (c) refused. The authors will always be informed of the reviewers' opinion.

The referees' opinions will be analyzed by the associated editors, who will then suggest to the Scientific Editor whether the manuscript should be published. The Editor-in-Chief will make the final decision regarding the publication of the manuscript (Approved or Rejected).

Rejected manuscripts that can be reformulated may be submitted again as a new manuscript and undergo a new assessment process.

When changes are requested by the referees, the manuscript will be returned to the authors along with the referees' opinions and suggestions. The authors have 20 (twenty) days to make the adjustments, respecting the Greenwich (London) time.

Accepted manuscripts: manuscripts accepted for publication may return to the authors for approval of eventual changes made

during the editing and formatting processes, according to the Journal's style.

Publication in English: if approved, the articles will be published in English. For the manuscript to be published, the authors must provide the English translation of the version approved by the Journal. The translation is paid for by the authors.

In order to guarantee the quality and uniformity of the translated manuscripts, the manuscript must be translated by a highly trained translator with proven experience in the translation of scientific texts, indicated and certified by the Journal.

If the manuscript needs reviewing by one of the translators indicated by the Journal, the authors must follow the formatting instructions provided by e-mail by the Journal. The authors are responsible for verifying the entire translation (body of the text, illustrations, tables, charts, etc.).

Preparing the Manuscript

The Journal only publishes original articles in English. However, the authors may submit the articles in Portuguese, and if the article is accepted for publication, the Journal will provide the name and contact information of translators certified by the Journal. The translation is paid for by the authors.

Article Category

Original: contributions that aim to disclose the results of unpublished researches, taking into account the relevance of the theme, the scope and the knowledge generated for the research area (maximum limit of 3,500 thousand words - including resumo, abstract, tables, graphs, figures and references).

Review (by invitation): synthesis of the knowledge available on a given theme, based on analysis and interpretation of the pertinent literature, aiming to make a critical and comparative analysis of the works in the area and discuss the methodological limitations and its scope. It also allows the indication of perspectives of continuing studies in that line of research (maximum limit of 4 thousand words – including resumo, abstract, tables, graphs, figures and references). There will be a maximum of two reviews per issue.

Research note: partial unpublished data of an ongoing research (maximum limit of 1,500 thousand words – including resumo, abstract, tables, graphs,

figures and references).

Thematic Section (by invitation): section whose aim is to publish 2 or 3 coordinated articles from different authors covering a theme of current interest (maximum of 10 thousand words – including resumo, abstract, tables, graphs, figures and references).

Articles category and subject area: Authors should indicate the article's category and subject area, namely: food and social sciences, nutritional assessment, nutritional biochemistry, nutrition, nutrition education, epidemiology and statistics, micronutrients, clinical nutrition, experimental nutrition, nutrition and geriatrics, nutrition, maternal and infant nutrition in meal production, food and nutrition policies and health.

The Journal of Nutrition does not assess studies that have already been presented in national or foreign events and/or translated into other languages in order to preserve the originality of the study.

The text should not exceed the number of words established according to article category.

Text structure

The manuscript text should be prepared as follows:

- 1.5 spacing between the lines;
- Arial 12 pt;
- The total number of words in the manuscript should be within the word limit according to its category (the word count should include the words in the abstract and body of the manuscript but not the cover page, references, and illustrations);
- It should be arranged in the following order, including the items that must be presented on separate pages:
 - Cover page (page 1);
 - Resumo/Abstract (page 2);
 - Text (page 3);
 - References (in a separate page below the text);
 - Illustrations (include each one on a separate page below the references);
- Manuscript should be prepared using a word processor similar to Microsoft Word 2010;
- Use A4 paper; top and bottom margins of 2.5 cm; left and right margins of 3 cm;
- Page numbers must be placed on the lower left-hand corner;
- References format should facilitate manuscript revision and editing. Therefore, they should be written according to the Vancouver style, using 1.5 spacing between the lines and 12-point font size;
- The illustrations (Figures and Tables) must be inserted below the References, each one on a separate page, regardless of their size.

The cover page must contain:

- a) Complete title in Portuguese: (i) the title must be concise and avoid unnecessary and/or redundant words, such as "assessment of," "considerations about," "an exploratory study about;" (ii) do not use abbreviations or indicate the geographic location of the study.
- b) Suggest a short title in English and Portuguese or Spanish for the header with no more than 40 characters with spaces.
- c) Include complete title in English compatible with the title in Portuguese.
- d) Include the full name of each author. Do not abbreviate the first names. The list of authors, included below the title, should be limited to 6. The Journal strongly recommends that every author and co-authors keep their CV updated on the Lattes Platform for the submission of articles.
- e) Include the authors' academic degree (master's, doctor's, etc.), their current institutional affiliation (only one affiliation per author in 3 levels of affiliation, without abbreviations or acronyms), and city, state, and country.
- f) Indicate the full address of the institution of the corresponding author.
- g) Inform the telephone number and e-mail address of all authors.
- h) Explicitly inform the contribution made by each author. Authorship credit must be based on substantial contributions, such as study conception and design, data analysis and interpretation, article review, and approval of the final version. Including the names of authors who have not made any of the contributions above is not justified. Authors' contribution should be written in the language the article will be published.
- i) Inform the ORCID® (Open Researcher and Contributor ID) record number. If you do not have one, register for free at: < <https://orcid.org/register>>. Learn more [here](#).
- j) Inform whether the article is based on a dissertation or thesis, indicating the title, author, university, and year of publication.
- k) Indicate the following items:
Article category;
Subject Area;
Total number of illustrations (tables, pictures, and figures);
Total number of words (according to the manuscript category).

The authors may include a footnote to acknowledge the sponsor and indicate the number of the process and/or notice, and to acknowledge the collaboration of peers and technicians. The paragraph may not exceed three lines. Note: this must be the only part of the text identifying the authors, and other types of notes will not be accepted (except in translation of quotations).

Manuscript assessment will only begin after the inclusion of this information in the title page.

Abstract

All articles submitted in Portuguese or Spanish must contain an abstract in the original language and in English, with at least 150 words and at most 250 words.

The text should not contain citations and abbreviations. Provide from 3 to 6 keywords using Bireme's Health Sciences descriptors. <http://decs.bvs.br>.

The articles submitted in English must contain an abstract in Portuguese in addition to the abstract in English.

Text

Except for the manuscripts presented as Review, Communication, Scientific Note and Assay, the works must follow the formal structure for scientific works:

Introduction

Must contain a current literature review pertinent to the theme and appropriate to the presentation of the problem, also emphasizing its relevance. It should not be extensive except for manuscripts submitted as Review Articles.

Methods

Must contain a clear and brief description of the method, including the corresponding literature: procedures, universe and sample, measurement tools, and validation method and statistical treatment when applicable.

Regarding the statistical analysis, the authors should demonstrate that the procedures were not only appropriate to test the hypotheses of the study but were also interpreted correctly. The statistical significance

levels (e.g. $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$) must be mentioned.

Inform that the research was approved by an Ethics Committee certified by the National Council of Health and provide the number of the protocol.

When experiments with animals are reported, indicate if the guidelines of the institutional or national research councils - or if any national law regarding the care and use of laboratory animals - were followed.

Results

Whenever possible, the results must be presented in self-explanatory tables and figures and contain statistical analysis. Avoid repeating the data in the text.

Discussion

The discussion must properly and objectively explore the results under the light of other observations already published in the literature.

Conclusion

Present the relevant conclusions, considering the objectives of the work, and indicate ways to continue the study. **Literature citations will not be accepted in this section.**

Acknowledgments: may be made in a paragraph no bigger than three lines to institutions or individuals who actually collaborated with the work.

Attachments: should be included only when they are essential to the understanding of the text. The editors will decide upon the need of their publication.

Abbreviations and acronyms: should be used in a standardized fashion and restricted to those used conventionally or sanctioned by use, followed by the meaning in full when it is first mentioned in the text. They must not be used in the title and abstract.

References must follow the Vancouver style

References must be numbered consecutively according to the order that they were first mentioned in the text, according to the Vancouver style.

In references that have up to 6 authors, display all of the author names. If the reference has more than 6 authors, cite the first 6 authors and then write "et al".

All authors should be cited in references with two to six authors; if more than six authors, only the first six should be cited followed by *et al.*

The abbreviations of cited journals should be in agreement with the Index Medicus.

At least 80% of the references must have been published within the last five years in indexed journals, and 20% within the last two years.

Citations/references of **undergraduate monographs, works** presented in congresses, symposiums, workshops, meetings, among others, and **unpublished texts** (classes among others) **will not be accepted**.

Citations of a journal article in press, whether it was written by one of the authors or by different sources, **must** be accompanied by a copy of the letter of acceptance (article accepted but not yet published) from the journal it is going to be published. If this requirement is not fulfilled, the citation/reference will be excluded.

If unpublished data obtained by other researchers are cited in the manuscript, it is necessary to include a letter authorizing the use of such data by the original authors.

When the cited document has a DOI (Digital Object Identifier) number, inform the number and exclude the access date (see examples of electronic material). The hyperlink <https://doi.org/...> must be used.

Reference citations in the text should be presented in numerical order, in Arabic numerals enclosed in square brackets (eg. [1], [2], [3]), after the author's surname, and they must be included in the list of references.

Direct citations translated by the authors must be accompanied by a footnote containing the text in the original language. Indicate that the citation was translated by the author as follows: (Rodgers *et al.*, 2011, our translation).

The accuracy and appropriateness of references to works that have been consulted and mentioned in the text of the article are of the author(s) responsibility. All studies cited in the text must be listed in the References.

Examples

Journal article in print

Canuto JMP, Canuto VMP, Lima MHA, Omena ALCS, Morais TML, Paiva AM, *et al.* Fatores de risco associados à hipovitaminose D em indivíduos adultos infectados pelo HIV/aids. Arch Endocrinol Metab.

2015;59(1):34-41.

Article with more than six authors in electronic media

Fuermaier ABM, Tucha L, Janneke K, Weisbrod M, Lange KW, Aschenbrenner S, *et al.* Effects of methylphenidate on memory functions of adults with ADHD. *Appl Neuropsychol Adult*. 2017 [cited 2017 May 15]; 24(3):199-211. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23279095.2015.1124108>

Article that includes a DOI number

Lazarini FM, Barbosa DA. Intervenção educacional na Atenção Básica para prevenção da sífilis congênita. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2017 [citado 2017 maio 2];25:e2845. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.1612.2845>

Book

Damiani D. *Endocrinologia na prática pediátrica*. 3ª ed. Barueri: Manole; 2016.

Electronic book

Lomer M. *Advanced nutrition and dietetics in gastroenterology*. Oxford: Wiley; 2014 [cited 2017 June 6]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118872796.fmatter/pdf>

Book chapter

Cominetti CR, Horst MM, Aderuza M. Parte 4: nutrientes, genômica nutricional e relação saúde-doença. In: Cominetti CR, Horst MM, Aderuza M. *Genômica Nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular*. Barueri: Manole; 2015.

Electronic book chapter

Baranoski MCR. Cidadania dos homossexuais. In: Baranoski MCR. *A adoção em relações homoafetivas*. Ponta Grossa: UEPG; 2016 [citado 2017 maio 25]. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/ym6qv>

Dissertations and Theses

Lee T. *Comparing mindfulness-enriched weight management to current standard practices [these]*. Lexington: University of Kentucky; 2017.

Electronic texts

Loss S. *Nutrição enteral plena vs hipocalórica no paciente crítico*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral; 2017 [acesso 2017 maio 25]. Disponível em: www.sbnpe.com.br/news-braspen/atualizacao-em-tn/nutricao-enteral-plena-vs-hipocalorica-no-paciente-critico.

Software

Brubins Comércio de Alimentos e Supergelados. *Dietwin: software de nutrição*. Porto Alegre: Brubins Comércio de Alimentos e

Supergelados Ltda; 2017.

For other examples please see the norms of the Committee of Medical Journals Editors (Vancouver Group) at <<http://www.icmje.org>>.

Preparing the illustrations

All types of tables, figures, graphs, drawings, schemes, flowcharts, photographs, maps, organograms, diagrams, blueprints, charts, pictures, etc., are considered illustrations, which serve to illustrate study data. **All empirical studies must include the study location and year.** Figures must not repeat the data in tables or already described in the text.

The maximum number of illustrations accepted per article is 5 (five), regardless of type.

The illustrations must be inserted below the references and should also be submitted as separate files in their original source file through the ScholarOne platform, in Step 6.

The illustrations **must be editable**. The following graphic design software and word processor are accepted: Excel, GraphPrism, SPSS 22, Corel Draw Suite X7, and Word. Therefore, images can be submitted only in the following file extensions: cdr, .pzd, .spv, .jpg, .jpeg, .xls, .xlsx, .doc, .docx, .vsdx, .vst. If a different software is used, use the standard font Frutiger size 7, which is the font used by the Journal during editing.

Images must have a minimum resolution of 600 dpi. Graphs and drawings must be generated in graphic design programs, such as Microsoft Excel, CorelDraw, Adobe Illustrator, etc., and accompanied by their quantitative parameters in a table. Include the names of all variables.

Graphs must not contain the grid lines, and their elements (bars, circles) must be two dimensional (3D not accepted).

The author is responsible for the quality of the illustrations. Make sure it is possible to reduce the size of the illustrations to the widths of one or two columns (7 cm and 15 cm respectively) without loss of resolution. **The landscape format is not accepted.**

Provide a short and concise title to each illustration and number them consecutively and independently using Arabic digits in the order that they are mentioned in the text. Charts and tables must

have open side borders.

Graphs must contain the title of all axes and all columns of Tables and Charts must have headers.

The words **Figure**, **Table**, and **Attachment** in the text must be capitalized and accompanied by the respective number. Indicate in the text where the illustrations should be inserted. Keep titles concise.

Always include explanatory notes. If any abbreviation or symbol (bold, asterisk, etc.) is used, inform its meaning in the subtitle of the illustration.

Manuscripts written in languages other than Portuguese should include accurate translation of the illustrations (tables, charts, and figures) and use the proper decimal separator. For example, in manuscripts written in English, the dot or period is used as the decimal point within numbers: 1,254.76 grams.

If illustrations published in other sources are used, attach the document containing the authorization for their use and cite the source. In the case of photographs, it is necessary to include a statement with a written permission to use the image, even if there is an attempt to hide the identity of the person (s) in the photographs.

The authors are responsible for ensuring that nothing in the manuscript infringes any existing copyright or intellectual property right of a third-party, otherwise they may be subjected to legal action, according to the Law No. 9.610/98, which governs copyright.

The use of color images is recommended, and color articles are published free of charge.

Submission Checklist

Download the submission checklist [here](#). Its completion is mandatory, and it must be signed and attached to ScholarOne, along with the other documents.

Reviewed version

Send the copies of the reviewed version to the site <http://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo>. **The author(s)**

must send only the last version of the work.

All corrections requested by the referees must be made with blue font or underlined. The author(s) must attach a letter to the editor to the corrected version of the manuscript, reiterating their interest in publishing in the Journal and listing the changes that were made in the manuscript. If the author(s) disagree with any of the recommendations made by the referees, they must present arguments that justify their position. If the authors do not resubmit the reformulated article and response letter within the deadline, the editorial process will be terminated at any phase of the submission. The manuscript title and protocol number must be specified.

After acceptance**Proofs**

PDF proofs will be sent to the authors for correction of the final art of the manuscript. The proofs must return to the Editing Center of the Journal before the deadline (within 48 hours). Other changes to the manuscript will not be accepted during this stage.

Only spelling corrections or the substitution of one or another word and numerical data in the tables and graphs will be accepted. The inclusion and/or exclusion of sentences, paragraphs, images, and references will not be accepted. If something needs correcting, please do so as follows:

- 1) In the PDF file using the available resources; or
- 2) Place a note in upper case letters in the margin of the paper and send only the scanned pages with corrections; or
- 3) Make a list in a Word document informing: page, column (right or left), corresponding paragraph, beginning of the sentence, and its respective line.

The authors must sign the terms of agreement with the final art (text and illustrations), whose models will be sent along with the proofs.

Documents

At the time of submission, it is mandatory that the authors send the following documentation with the article:

- 1) Cover letter for the submission of the article. [\[Template\]](#)

- 2) Completed and signed submission checklist.
- 3) All authors' Curriculum Lattes updated in the last three months (only Brazilian authors). [[Template](#)]
- 5) Copy of the approval letter from the Research Ethics Committee.
- 6) Proofreading declaration of the translated manuscript.

All authors listed in the cover page must sign the documents. The signed documents must be submitted in Stage 6 of the submission process of the ScholarOne platform.

Pictures of signatures will not be accepted. Only scanned or electronic signatures are accepted to avoid any type of fraud. The documents should be submitted in image and PDF formats.

Revista de Nutrição (Brazilian Journal of Nutrition)

All articles must be submitted electronically according to the instructions published at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo>.

Núcleo de Editoração SBI - Campus II Av. John Boyd Dunlop, s/n., Prédio de Odontologia - Jd. Ipaussurama - 13060-904 - Campinas, SP, Brasil.
Fone/Fax:+55-19-3343-6875

E-mail: sbi.submissionrn@puc-campinas.edu.br

URL: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo>