

IMPACTO DO USO DE SIMBIÓTICO NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM MODELO DE RATOS

The impact of the use of symbiotics in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model

Eliane TAGLIARI¹, Antonio Carlos CAMPOS², Thais Andrade COSTA-CASAGRANDE¹, Paolo Rogério SALVALAGGIO¹

Trabalho realizado no ¹Departamento de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo, Curitiba, PR; ²Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

RESUMO - Racional: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada por acúmulo de lipídios intra-hepáticos. O uso de microrganismos vivos promove diversos efeitos benéficos; porém, a utilização de simbióticos e sua atuação na DHGNA ainda não está totalmente esclarecida. **Objetivo:** Verificar se a administração de simbióticos influencia na ocorrência e na progressão da DHGNA em ratos, após a indução de esteatose hepática por dieta hipercalórica. **Método:** Quarenta e cinco ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: G1 (controle); G2 (controle+simbiótico); G3 (hipercalórica+ simbiótico) e G4 (hipercalórica), e eutanasiados após 60 dias de dieta. Coleta de sangue foi realizada para obtenção de análises bioquímicas e dosagem de IL6, e de tecido para análise histológica do fígado. **Resultados:** O simbiótico não influenciou no ganho de peso e no coeficiente de consumo alimentar nos grupos G3 e G4. Já G2 obteve maior ganho de peso, enquanto G1 apresentou o maior coeficiente de consumo alimentar entre os grupos. G1 apresentou maior expressão de aspartato aminotransferase em relação ao G2 (150±35 mg/dl e 75±5 mg/dl), enquanto G4 teve maior expressão desta enzima em relação ao G3 (141±9,7 mg/dl e 78±4 mg/dl). A análise histológica hepática mostrou diferentes estágios de evolução da DHGNA entre os grupos. Animais do G4 apresentaram aumento sérico de interleucina-6 quando comparados a G3 (240,58±53,68 mg/dl, e 104,0±15,31 mg/dl). **Conclusão:** Os simbióticos reduziram aminotransferases hepáticas e a expressão de interleucina-6. No entanto, a histopatologia demonstrou que o simbiótico não foi capaz de prevenir a severidade da DHGNA em ratos.

DESCRITORES - Hepatopatia gordurosa não alcoólica. Probióticos. Microbiota.

Correspondência:

Eliane Tagliari
E-mail: elianetagliari@yahoo.com.br,
taisefuchs@hotmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há.

Recebido para publicação: 02/05/2017
Aceito para publicação: 20/06/2017

HEADINGS - Non-alcoholic fatty liver disease. Probiotics. Microbiota.

ABSTRACT - Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by accumulation of intrahepatic lipid. The use of live microorganisms promotes beneficial effects; however, the use of symbiotic and its role in NAFLD is not yet fully understood. **Aim:** Verify if the symbiotic administration influences the occurrence and progression of NAFLD in rats, after induction of hepatic steatosis by high calorie diet. **Method:** Forty-five rats were divided into four groups: G1 (control); G2 (control+symbiotic); G3 (high calorie+symbiotic) and G4 (high calorie), and euthanized after 60 days of diet. Liver disease was evaluated by biochemical analysis, IL6 measurement and histological assessment. **Results:** Symbiotic had influence neither on weight gain, nor on coefficient dietary intake in G3 and G4. G2 had the greatest weight gain, while G1 had the highest coefficient dietary intake between groups. G1 showed higher expression of aspartate aminotransferase than those from G2 (150±35 mg/dl, and 75±5 mg/dl) while G4 showed higher expression of the enzyme compared to G3 (141±9.7 mg/dl to 78±4 mg/dl). Liver histology showed different stages of NAFLD between groups. G4 animals showed increased serum interleukin-6 when compared to G3 (240.58±53.68 mg/dl and 104.0±15.31 mg/dl). **Conclusion:** Symbiotic can reduce hepatic aminotransferases and interleukin-6 expression. However, the histology showed that the symbiotic was not able to prevent the severity of NAFLD in rats.

INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada por acúmulo de lipídios em hepatócitos, que representa, ao menos, 5% do peso deste tecido. Ela inclui esteatose simples, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), fibrose, cirrose e o carcinoma hepatocelular. Estudos populacionais indicam que 10-50% da população pode apresentar esteatose hepática relativamente benigna. Cerca de 40% dos pacientes com DHGNA evoluem para esteatose hepática não alcoólica e 5% desenvolvem fibrose após 4-13 anos³.

Acredita-se que o desenvolvimento da DHGNA envolva duas fases. Na primeira ocorre o armazenamento inadequado de lipídios ou acúmulo ectópico desse nutriente. A segunda é marcada pelo estresse oxidativo que provoca lesão do hepatócito e leva ao desenvolvimento da inflamação²⁹.

Quando a fisiologia normal do fígado é alterada, e células inflamatórias são ativadas, ocorrem alterações dos mecanismos de controle e da ativação dos fatores derivados do intestino. O desequilíbrio na microbiota intestinal pode gerar lipopolissacarídeos que são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas e que chegam ao fígado por meio da veia porta, levando à endotoxemia¹⁴.

A produção de endotoxina pela microbiota intestinal pode causar inflamação

no fígado de pacientes com obesidade, diabete, doença metabólica, esteatose hepática e NASH²⁸.

Trabalhos usando microrganismos vivos (probióticos) ou fibras solúveis (prébióticos) no tratamento de diversas doenças, entre elas DHGNA, está bem estabelecido na literatura^{15,13}. Porém, o uso de simbióticos (associação de próbióticos com prébióticos) no controle da DHGNA e os mecanismos pelos quais eles diminuem o processo inflamatório e a progressão para os estágios mais avançados de DHGNA ainda não estão totalmente esclarecidos.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a administração de simbióticos influencia a ocorrência de DHGNA em ratos e verificar se o simbiótico condiciona a redução dos níveis das enzimas hepáticas e marcadores pró-inflamatórios após indução de esteatose hepática por dieta hipercalórica.

MÉTODOS

Animais

As experiências com animais foram realizadas nos termos institucionais de acordo com as normas previstas na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, com as normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e após aprovação da Comissão de Ética do uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo, protocolo número 181-2013.

Foram utilizados 45 ratos Wistar adultos, machos, com peso aproximado de 200 g procedentes do biotério da Universidade Positivo. Os animais foram mantidos em condições de ambiente controlado, com controle de temperatura, luminosidade e umidade do ar. Eles foram divididos em quatro grupos, conforme fornecimento de simbiótico e da dieta fornecida.

Dieta e simbiótico

Antes do experimento propriamente dito foi realizado um estudo piloto de indução de esteatose em cinco ratos em um período de 30 dias, segundo metodologia utilizada por Cintra et al.⁹. Os animais foram induzidos à dieta hipercalórica (associação de dieta hiperglicídica+hiperlipídica) a fim de representar um perfil mais realista da dieta ocidental rica em carboidratos e gorduras^{2,18,23,27}. Após confirmado o modelo padrão a ser seguido durante o estudo piloto, o experimento foi executado com a divisão dos animais em quatro grupos de 10 animais cada, a saber: Grupo 1 (G1) - com ração padrão indicada pelo biotério, durante 60 dias; Grupo 2 (G2) - com dieta padrão acrescida de simbiótico durante 60 dias; Grupo 3 (G3) - com dieta hipercalórica por 30 dias para indução da esteatose e após este período manteve-se a dieta hipercalórica acrescida de simbiótico por mais 30 dias, perfazendo total de 60 dias; Grupo 4 (G4) - com dieta hipercalórica por 30 dias para indução da esteatose mantendo-a por mais 30 dias, perfazendo total de 60 dias.

A distribuição das dietas e do simbiótico durante o experimento ficou assim determinada: dieta padrão do biotério: ração Presence® Labina; dieta hiperglicídica: 20% de frutose administrada por água ad libidum (em que para cada litro de água foi adicionada 200 g de frutose pura); dieta hiperlipídica desenvolvida conforme estudos de Cintra et al⁹ e Reeves et al²⁴ na seguinte proporção: dieta composta por dieta padrão da AIN93-G (do American Institute Nutrition, AIN-1993)+35% de gordura animal, desenvolvida por PRAG Soluções Ltda. O simbiótico foi composto com cepas (doses 1x10⁹UFC/g)²¹

Lactobacillus paracasei LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM® e fruto-oligossacarídeo (5,5 g) na

dose diária de 200 mg/kg/dia/animal, via oral, o que corresponde à dose aproximada de 200.000 a 206.109 UFC (unidades formadoras de colônias), administrado sete vezes por semana, durante 30 dias, via oral, com auxílio de uma espátula adaptada para este trabalho (Figura 1). Esta dosagem foi escolhida porque corresponde, pelo menos em parte, à dosagem diária indicada aos seres humanos (cerca de 14 g)¹⁰.



FIGURA 1- Administração do simbiótico via oral

Procedimentos com os animais e laboratoriais

No decorrer do experimento foi realizada pesagem a cada dois dias da dieta remanescente. O peso corporal dos animais foi registrado a cada 30 dias para avaliação do ganho de peso. Estes dados foram utilizados para determinar o coeficiente de eficiência alimentar (CEA)⁵. Ele foi calculado por meio da equação: $CEA = [\text{ganho de peso (g)}] / [\text{consumo alimentar (g)}]$. Após 60 dias os animais foram anestesiados, com inalação de isoflurano, para colheita de 4 ml de sangue (punção cardíaca) por animal imediatamente antes do procedimento de eutanásia.

Foram avaliados níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e enzimas aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e alanina aminotransferase (ALT ou TGP), no final do experimento. Também foi dosada a quantidade de IL-6 no sangue com um kit próprio (IMMU-EK0412- IL-6 Rat Elisa Kit, Boster Biological, Fremont, CA, EUA) no final do experimento. Os animais foram eutanasiados com inalação de isoflurano seguida de intoxicação por dióxido de carbono em câmara de CO₂ (Baxter®, Chicago, EUA). Em seguida o fígado e o intestino foram coletados e colocados em formol 10% para fixação e após 48 h foram emblocados em parafina, cortados em micrótomo, na espessura de 5 µm, corados com H&E e analisados quanto ao desenvolvimento da esteatose na histopatologia. Foram realizadas análises histológicas do intestino, a fim de avaliar alterações quanto à arquitetura, folículo linfóide e a presença ou não de inflamação aguda ou crônica. No fígado foi mensurado o grau de inflamação e sua intensidade (leve, moderada ou grave) e a porcentagem de células gordurosas, sendo o sistema de classificação adaptado de Brunt et al.⁵.

Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas em média e erro-padrão. Para comparação dos grupos, foi considerado o modelo de análise de variância. Quando, em algum momento, rejeitou-se a hipótese de igualdade das médias dos quatro grupos, eles foram comparados dois a dois, considerando-se o teste LSD. Para as comparações de cada momento de avaliação com o primeiro momento avaliado foi considerado o teste t de Student para amostras pareadas. Para avaliação da interação entre momento de avaliação e grupo, para a variável ingestão de ração, foi considerado o modelo Split-

Plot. Para comparação dos grupos em relação à classificação de esteatose foi considerado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para avaliação da condição de normalidade das variáveis, foi considerado o teste de Jarque-Bera. Valores de p menores do 0,05 indicaram significância estatística.

RESULTADOS

Todos os grupos apresentaram ganho de peso no final de experimento e a Tabela 1 demonstra a sua evolução. O grupo G1, com dieta controle, apresentou menor ganho de peso final em relação aos outros grupos. Os grupos G1 e G2 apresentaram menor ganho de peso final em relação aos grupos com dieta hiperlipídica G3 e G4. Quando comparados os grupos que utilizaram o simbiótico (G2xG3), o grupo com dieta controle teve menor ganho aos 30 dias ($292,4 \pm 28,1$, $p < 0,001$). Quando comparado o grupo que utilizou a dieta controle ao grupo que usou simbiótico (G1xG2), o G2 teve maior ganho de peso ($p < 0,001$). Quando comparados os grupos que utilizaram a dieta hipercalórica (G3xG4), o uso do simbiótico (G3) não influenciou no ganho de peso ($p > 0,05$).

TABELA 1 - Avaliação de peso dos animais do estudo.

| Grupo | Peso inicial | 30 dias | 60 dias |
|-------|--------------|------------|------------|
| G1 | 241,4±17,2 | 326,4±13,1 | 363±20,7 |
| G2 | 259,5±20,8 | 292,4±28,1 | 396,8±43,6 |
| G3 | 255,8±20,1 | 343,2±35,3 | 425,6±33,8 |
| G4 | 260,3±17,4 | 337±24,1 | 433,4±23 |

Foram avaliados o consumo de ração, água e frutose e todos os grupos apresentaram consumo semelhante nas primeiras semanas. Após a terceira semana, o consumo de ração dos grupos G3 e G4 diminuiu 15% em relação aos demais grupos. O consumo de água e de frutose manteve-se semelhante durante todo tempo em todos os grupos.

Quando comparados os grupos com dieta controle (G1 e G2) o grupo G1 teve CEA maior ($p = 0,012$). Quando comparados os grupos com dieta hipercalórica o consumo foi semelhante entre os grupos, $G3 = G4$ (Figura 2).

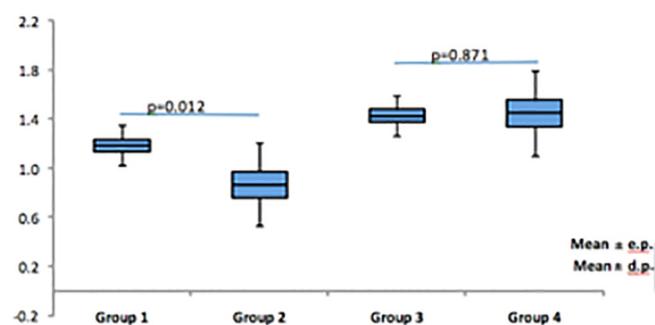


FIGURA 2 - Coeficiente de eficiência alimentar - CEA - dos animais

A Figura 3 apresenta os valores das aminotransferases obtidos no final do experimento. Quando comparados os grupos com dieta controle, observou-se que o grupo controle (G1) teve a maior expressão de ALT (150 ± 35 mg/ml no G1 vs. 75 ± 5 mg/ml no G2, $p < 0,001$). Quando comparados os grupos com dieta hipercalórica, o grupo (G4) teve maior expressão de ALT ($62,1 \pm 5$ mg/ml no G3 vs. $95,6 \pm 8,6$ mg/ml no G4, $p = 0,104$). Ainda na Figura 3 em relação à AST, animais do grupo controle (G1) tiveram aumento de AST (165 ± 23 mg/ml no G1 vs. 94 ± 6 mg/ml no G2, $p = 0,001$). Quando comparados os grupos com dieta hipercalórica, o grupo (G4) teve maior expressão de AST (78 ± 4 mg/ml no G3 vs. $141 \pm 9,7$ mg/ml no G4, $p < 0,002$). Os grupos que usaram o simbiótico (G2 e G3) tiveram menor variação de AST.

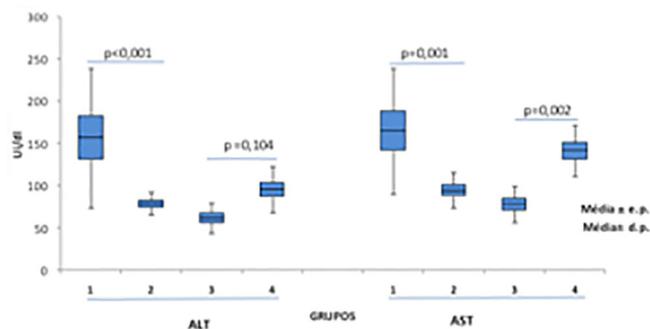


FIGURA 3 - Determinação das aminotransferases (grupos)

Os valores de colesterol não tiveram diferença entre os grupos e não se alteraram dos valores de referência para a espécie¹⁶. O grupo controle (G1) teve maior valor de triglicérides em relação ao grupo G3 ($102,9$ mg/dl vs. $61,5$ mg/dl, $p < 0,001$), porém nenhum dos grupos teve valores maiores que os de referência para a espécie¹⁶.

A Tabela 2 expressa a análise histológica do grau de esteatose entre os grupos. Os grupos suplementados com o simbiótico G2 e G3 apresentaram esteatose, porém a evolução da doença foi diferente entre eles. No grupo G2 20% dos animais não desenvolveram a doença, e houve predomínio da esteatose leve (60%); já no G3 todos desenvolveram doença, predominando a esteatose moderada (50%), seguida da leve (40%). Ambos os grupos tiveram proporção de 10% dos animais que evoluíram para a esteatose severa.

TABELA 2 - Avaliação histológica do fígado dos animais do estudo

| Grupo | Esteatose | | | | | | | | Total | p |
|-------|-------------|-----|----------|-----|--------------|-----|-----------|-----|-------|-------|
| | 0 (ausente) | | 1 (leve) | | 2 (moderada) | | 3 (grave) | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | | |
| 1 | 4 | 40% | 4 | 40% | 2 | 20% | 0 | 0% | 10 | |
| 2 | 2 | 20% | 6 | 60% | 1 | 10% | 1 | 10% | 10 | |
| 3 | 0 | 0% | 4 | 40% | 5 | 50% | 1 | 10% | 10 | 0,030 |
| 4 | 0 | 0% | 4 | 40% | 6 | 60% | 0 | 0% | 10 | |

Quando comparados G1 e G4, no G1 40% dos animais não apresentaram esteatose, 40% tiveram esteatose leve e 20% moderada. No G4 predominou a esteatose moderada (60%) seguida da leve (40%). Ambos os grupos não tiveram evolução igual para a esteatose severa.

A Figura 4 demonstra os cortes histopatológicos com esteatose entre os grupos. Os grupos que receberam a dieta controle (G1 e G2) apresentaram menor grau de evolução de esteatose, quando comparados aos demais grupos (G3xG4), que receberam a dieta hipercalórica. Entre os grupos que receberam o simbiótico (G2xG3), o grupo G2 teve menor evolução de esteatose.

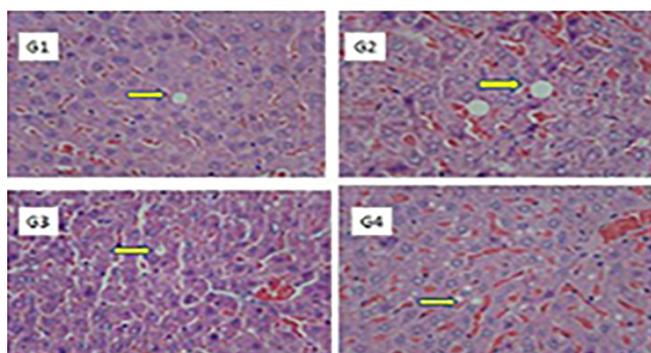


FIGURA 4 - Cortes histológicos hepáticos (100x) com ausência de inflamação e fibrose e esteatose (seta)

Todos os animais de todos os grupos apresentaram arquitetura celular preservada e sem inflamação crônica ou aguda no intestino. Nos grupos G2 e G4 10% dos animais apresentaram alteração no foliculo linfóide; no G3, 20%.

A Figura 5 expressa a avaliação da IL-6 entre os grupos do estudo. Os animais dos grupos G1 (105,66±23,32 mg/dl) e G2 (124,90±13,80 mg/dl) não apresentaram diferenças estatísticas ($p=0,734$) quanto a expressão sérica de IL-6. Quando comparados G3 (104,0±15,31 mg/dl, $p<0,028$) x G4 (240,58±53,68 mg/dl, $p<0,007$) mostrou que o G4 teve maior expressão sérica de IL-6. Entre os grupos que usaram o simbiótico G2 (124,0±13,80 mg/dl) vs. G3 (104,0±15,31 mg/dl) não houve diferença estatística em relação a expressão de IL-6, $p < 0,389$.

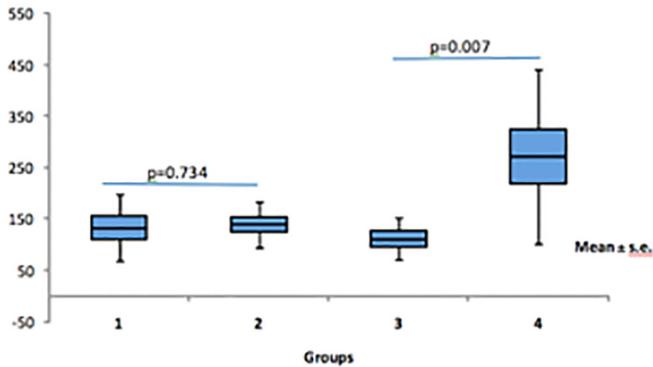


FIGURA 5 - Avaliação da IL-6 nos grupos

DISCUSSÃO

O papel do simbiótico no controle da progressão da esteatose hepática não está totalmente compreendido. O objetivo central deste trabalho, após oito semanas de protocolo experimental foi avaliar se o consumo de um simbiótico pode impactar no desenvolvimento de DHGNA em ratos.

Observou-se que o simbiótico reduziu os níveis de aminotransferases, mas foi incapaz de alterar a progressão histológica da DHGNA em modelo experimental utilizado. A diferença na evolução da esteatose pode estar relacionada com a composição da dieta. No entanto, esteatose, normalmente, não evolui para o estágio avançado de fibrose em modelos experimentais⁵. Os resultados também podem estar relacionados com a microbiota intestinal, pois o perfil metabólico e a composição bacteriana da microbiota, determinam resposta inflamatória maior ou menor, dependendo das cepas predominantes do hospedeiro¹⁹. Simbióticos também podem alterar a síntese dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), devido à presença de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e oligossacarídeos^{6,26}. SCFA podem alterar a expressão de genes envolvidos na neoglicogênese ou beta-oxidação, aumentando assim a extração de energia a partir da dieta e a gordura intra-hepática. SCFA também podem alterar a sinalização do apetite e a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória¹¹.

A constatação mais importante deste estudo foi a redução da IL-6 com a utilização de simbióticos. IL-6 está envolvida não só na resposta da lesão hepática aguda, mas também no metabolismo do tecido adiposo, na atividade da lipoproteína lipase, e na secreção hepática dos triglicéridos¹². Estes resultados mostram que os animais que receberam dieta hipercalórica tinham maior expressão de IL-6 quando comparados com os grupos controle, que receberam dieta similar, porém suplementada com simbióticos. Feldstein et al¹² demonstraram maior expressão de IL-6 no fígado de pacientes com DHGNA, correlacionando-a assim de forma positiva com a gravidade da inflamação e a fibrose.

Outros estudos em humanos relataram resultados similares ao presente estudo. Terapias probióticas reduziram

transaminases hepáticas, TNF- α e a expressão de IL-6 e melhoraram a resistência à insulina em pacientes com DHGNA^{10,19}. Os resultados recentes demonstraram que simbióticos aumentam os níveis de *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* no intestino de doentes com câncer do cólon e síndrome do intestino irritável. Estudos futuros devem especificamente investigar o papel das bactérias específicas na DHGNA²⁵.

Outras conclusões deste estudo merecem atenção especial. A primeira relaciona-se com o modelo experimental. Indução de esteatose em roedores normalmente utiliza dieta hiperlipídica ou hiperglicídica, sob sedação e através de um tubo de alimentação, que vai desde 21 a 30 dias^{1,4,16,30}. Optou-se por dieta hiperlipídica e hiperglicídica combinada, o que representa um perfil mais realista da dieta ocidental. Para a administração simbiótica foi utilizada uma espátula²³. Não foi encontrado relatório anterior deste método de entrega simbiótica até o presente momento. Este método simples, reproduzível e inovador de entrega simbiótica com uma espátula, sem a necessidade de um tubo de alimentação ou sedação pode certamente contribuir para a pesquisa científica, permitindo que em estudos futuros, outras estirpes e dosagens de bactérias possam ser utilizadas da mesma maneira.

Em segundo lugar, o simbiótico foi incapaz de controlar o ganho de peso neste estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Assis et al.². Mais estudos são necessários para determinar se o simbiótico pode alterar a deposição de gordura corporal e ganho de peso.

Em terceiro lugar, acredita-se que o consumo do simbiótico poderia explicar o nível mais baixo da CEA no G2. Os possíveis mecanismos que envolvam a perda de peso corporal pode ter ocorrido por meio da estimulação das incretinas, como o glucagonlike peptide-1 (GLP1) e neuropeptídeo-Y (NPY), desencadeando maior saciedade e, conseqüentemente, reduzindo o consumo de alimentos^{7,22}.

Finalmente, o simbiótico não teve impacto sobre os níveis de colesterol. Uma recente metanálise mostrou resultados controversos da redução do colesterol com o uso de simbióticos⁷. Além disso, a redução dos triglicéridos com o uso de simbióticos não foi estatisticamente significativa neste estudo, semelhante aos achados de Cani et al.⁸.

O presente estudo teve algumas limitações. A primeira é o curto período de acompanhamento dos animais. A segunda refere-se ao fato de que optou-se por avaliar um único marcador inflamatório (IL-6). Finalmente, utilizaram-se cepas de bactérias comuns em dosagem que imita o uso humano. É possível que diferentes combinações de diferentes cepas e dosagens, bem como a composição da microbiota intestinal dos animais, possam interferir nos resultados. No futuro, à medida que ocorrerem avanços da metagenômica, poder-se-á ter conhecimento mais preciso de todos os mecanismos envolvidos na relação intestino-fígado, possivelmente prever a gravidade da DHGNA.

Em resumo, a administração de simbióticos foi associada a níveis reduzidos de aminotransferases e expressão de IL-6. No entanto, o simbiótico foi incapaz de prevenir a progressão da esteatose hepática em ratos.

Novos estudos devem ser realizados, ampliando a utilização de outros marcadores e confirmando o modelo escolhido de administração do simbiótico via oral.

CONCLUSÃO

Simbiótico pode ser uma alternativa no tratamento da DHGNA, pois de acordo com os resultados encontrados foi capaz de reduzir as aminotransferases hepáticas e a expressão de IL-6. Porém, contrariando as análises bioquímicas, a histologia mostrou que o simbiótico não foi capaz de impedir a severidade da doença.

REFERÊNCIAS

1. Armutcu FM, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak MI. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005; 38(6): 540-547.
2. de Assis AM, Rieger DK, Longoni A, Battu C, Raymundi S, da Rocha RF, Andreazza AC, et al.
3. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". *World J Gastroenterol* 2013; 19(8): 1158-65.
4. Beltrão de Lima FD, Costa de Carvalho MJ, Filizola RG, et al.
5. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9): 2467-74.
6. Buddington RK, Kelly-Quagliana K, Buddington KK, Kimura Y. Non-digestible oligosaccharides and defense functions: lessons learned from animal models. *Br J Nutr* 2002; 87(Suppl 2): S231-9.
7. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr* 2004; 92(3):521-6.
8. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58(8): 1091-103.
9. Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 2008; 48(4): 628-37.
10. Clapper JR, Hendricks MD, Gu G, Wittmer C, Dolman CS, Herich J, Athanacio J, et al. *Am J of Physiol* 2013; 305(7): G483-G495.
11. Daubioul CA, Horsmans Y, Lambert P, Danse E, Delzenne NM. Effects of oligofructose on glucose and lipid metabolism in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(5): 723-726.
12. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009; 50(4):1072-8.
13. Flesch, Aline Gamarra Taborda, Poziomyck, Aline Kirjner and Damin, Daniel De Carvalho The therapeutic use of symbiotics. ABCD, arq. bras. cir. dig., Sept 2014, vol.27, no.3, p.206-209. ISSN 0102-6720
14. Heno-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, Flavell RA. The intestinal microbiota in chronic liver disease. *Adv Immunol* 2013; 117: 73-97.
15. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11(8): 506-14.
16. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr* 2009; 139(11): 2067-2071.
17. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Doria GAA, Leite BLS, Serafini MR, Albuquerque-Júnior, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 2014; 10 (4): 034601.
18. Melo SS, Nunes NSI, Baumgarten C, Tressoldi C, Faccin G, Zanuzo K, et al. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* s. st. Hil.) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas.
19. Musso G, Gambino R, Cassader M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 2010;21(1):76-83.
20. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010; 52(2): 774-88.
21. Okubo H, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, Matsunaga Y, et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305(12): G911-8.
22. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 2012; 107(4): 601-13.
23. Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr* 2010; 140(5): 946-53.
24. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-51.
25. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Sci Technol* 2013; 50(1): 1-16.
26. Schley PD, Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* 2002; 87(Suppl 2): S221-30.
27. Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avnir I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamiss A. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens* 2007; 20(2): 206-10
28. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-Liver Axis and Sensing Microbes. *Dig Dis* 2011; 28(6): 737-744.
29. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52(5): 1836-46.
30. Wagnerberg S, Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Schröder M, Vetter W, Bischoff SC, Bergheim I. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: A mouse model. *J Nutr Biochem* 2012; 24(3): 531-538.