

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Aline Lopes Nascimento

Efeitos da suplementação dietética de farinha de abelha *Apis mellifera* na redução de esteatose hepática em camundongos obesos

Montes Claros

2022

Aline Lopes Nascimento

Efeitos da suplementação dietética de farinha de abelha *Apis mellifera* na redução de esteatose hepática em camundongos obesos

Exame de defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e saúde da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Área de Concentração: Efeitos dos Alimentos e suas tecnologias na Fisiopatologia e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses Alves Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-reitor: Alexandre Fernandes Moreira

Pró-reitor de Pesquisa: Mário Fernando Montenegro Campos

Pró-reitor de Pós-graduação: Fábio Alves da Silva Júnior

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE (CMAS)

Coordenador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Subcoordenadora: Prof^a Dra. Bruna Mara Aparecida de Carvalho Mesquita

Nascimento, Aline Lopes.

N244e
2022

Efeitos da suplementação dietética de farinha de abelha *Apis mellifera* na redução de esteatose hepática em camundongos obesos[manuscrito]/ Aline Lopes Nascimento. Montes Claros, 2022.
52 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Ulisses Alves Pereira

Banca examinadora: Junio Cota Silva, Lucinéia de Pinho.

Inclui referências: f. 37-40 e f. 42-49.

1. Abelha-européia -- Teses. 2 Entomofagia -- Teses. 3. Fígado gorduroso -- Teses. 4. Insetos comestíveis -- Teses. 5. Síndrome Metabólica -- Teses. I. Pereira, Ulisses Alves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 612.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 12 dias do mês de agosto de 2022, às 8:30 horas, sob a Presidência do Ulisses Alves Pereira, Dr. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Sérgio Henrique Sousa Santos, Dr. Sc. (Coorientador - UFMG/ICA), Junio Cota Silva, Dr. Sc. (UFMG/ICA) e Lucinéia de Pinho, Dr. Sc (Unimontes), reuniu-se, por Videoconferência, a Banca de defesa de dissertação da Discente **ALINE LOPES NASCIMENT**, Oaluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: “**Efeitos da suplementação dietética da farinha integral de abelha *Apis mellifera* na redução de esteatose hepática em camundongos obesos**”, sendo a aluna considerada aprovada. E, para constar, eu, Professor Ulisses Alves Pereira, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

Montes Claros, 12 de agosto de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ulisses Alves Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucineia de Pinho, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Henrique Sousa Santos, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Junio Cota Silva, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1675868** e o código CRC **22BEE028**.

Aos meus pais, João e Leonor, *in memoriam*, meus grandes mestres, maiores incentivadores, exemplo de persistência, dedicação, foco e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Senhor Soberano, por me sustentar até aqui, foste meu refúgio e socorro bem presente todas às vezes que clamei. Estendo essa gratidão aos meus progenitores, a saber, meus pais que, muito embora, já não estejam mais aqui, seus conselhos e terna torcida estiveram comigo a cada passo.

À minha família e irmã Jaciara, meu ombro amigo, em quem encontro forças para sempre prosseguir, meu porto seguro, meu exemplo maior de ser humano e profissional.

À minha professora e mestra de graduação Paula Karoline Soares, grande incentivo quanto à pesquisa, foste uma das pessoas em que me inspirei, motivada pela sua dedicação.

Aos meus colegas de mestrado por fazer desse tempo uma etapa de crescimento e aprendizados emoldurados pelas trocas de experiências, em especial Jéssica, Lívía, Guilherme, Joyce e aos meus colaboradores Bruna e Victor.

À Marileide, pelo profissionalismo, pela presença e palavras de incentivo na jornada laboratorial.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde (CMAS) pela grandiosa oportunidade de formação, pela dedicação dispensada a mim, enquanto aluna, contribuindo com excelência em minha formação profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos por todo o apoio, profissionalismo, sabedoria e por todos os ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ulisses Pereira Alves, pela presença, compreensão e por ter contribuído para minha formação no ambiente científico.

Aos animais que contribuíram em toda a extensão do experimento, sendo que com a ausência deles, nada do que foi realizado, se faria.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo incentivo e por promover, incondicionalmente, a ciência e a pesquisa no Brasil.

À Banca Examinadora por dispensar tempo de estudo, avaliações, sugestões, e atenção para com o meu trabalho.

“A ciência sem fé é loucura, e a fé sem ciência é fanatismo”.

Martinho Lutero

RESUMO

As doenças relacionadas ao metabolismo têm aumentado em todo o mundo, transformando em epidemia, sendo que a síndrome metabólica, é definida como grupo de fatores de risco que diretamente contribuem para o desenvolvimento de doença cardiovascular, diabetes do tipo 2 e doenças hepáticas. Dentre as doenças hepáticas, a esteatose hepática, está associada a carência nutricional. Com a dificuldade pela aquisição de alimentos de alto valor nutricional e funcional, o consumo de insetos tem apresentado resultados satisfatórios quanto aos benefícios à saúde. Dentro desse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da inclusão da farinha de abelha *Apis mellifera* sobre o metabolismo de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Para isso, camundongos da linhagem *swiss*, machos, após uma indução à obesidade, foram alimentados por 4 semanas e distribuídos em 6 grupos, sendo eles: Dieta Padrão (AIN93G); Dieta Padrão (AIN93G +15% de farinha de *Apis mellifera*); Dieta Padrão (AIN93G + 30% de farinha de *Apis mellifera*); Dieta Alto teor de gordura (HFD); Dieta Alto teor de gordura (HFD + 15% de farinha de *Apis mellifera*); Dieta Alto teor de gordura (HFD + 30% de farinha de *Apis mellifera*). Foram avaliados como parâmetros o peso do fígado, dados antropométricos, histologia do tecido hepático e expressão de mRNA. Os principais resultados da inclusão de farinha de *Apis mellifera* mostram que a mesma induziu a redução de esteatose hepática, peso, redução da adiposidade e mudanças específicas nos parâmetros histológicos. Além disso, também houve mudanças significativas na expressão genética, uma vez que, a farinha de *Apis mellifera* modula expressão do gene SREBP1c e o gene PPAR γ , importante modulador de lipídios. Modulou também positivamente o gene GPX4, que exerce proteção celular contra danos causados por estresse oxidativo, destacando assim, os efeitos benéficos da farinha de abelha *Apis mellifera* na saúde dos camundongos. Os principais achados mostraram o potencial da farinha integral de abelha *Apis mellifera* na redução da esteatose hepática no organismo. Portanto, conclui-se que a inclusão de farinha de insetos *Apis mellifera* na dieta gera efeitos benéficos à saúde metabólica.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Entomofagia. Esteatose Hepática. Insetos. Síndrome Metabólica.

ABSTRACT

The diseases related to metabolism have increased worldwide, becoming epidemic, and the metabolic syndrome, which is defined as a group of risk factors that directly contribute to the development of cardiovascular disease, type 2 diabetes and liver disease. Among liver diseases, hepatic steatosis is associated with nutritional deficiency. With the difficulty in acquiring foods with high nutritional and functional value, the consumption of insects has shown satisfactory results regarding the high nutritional value and health benefits. The *Apis mellifera* bee is a source of nutritional and functional food when related to health benefits. Within this context, the present study evaluated the effects of the inclusion of *Apis mellifera* bee meal on the metabolism of obese mice induced by a hyperlipidic diet. For this, male mice of the swiss strain, after an induction to obesity, were fed for 4 weeks and distributed in 6 groups, being them: Standard Diet (AIN93G); Standard Diet (AIN93G + 15% *Apis mellifera* meal); Standard Diet (AIN93G + 30% *Apis mellifera* meal); High Fat Diet (HFD); High Fat Diet (HFD+ 15% *Apis mellifera* meal); High Fat Diet (HFD + 30% *Apis mellifera* meal). Liver weight, anthropometric data, liver tissue histology and mRNA expression were evaluated as parameters. The main results of inclusion of *Apis mellifera* flour induced reduction of hepatic steatosis, weight, reduction of adiposity and specific changes in histological parameters. In addition, there were also significant changes in gene expression, since, *Apis mellifera* flour modulated the gene expression the SREBP1 gene and the PPAR α gene, an important lipid modulator, also modulated positively the GPX4 gene, which exerts cellular protection against damage caused by oxidative stress, thus highlighting the beneficial effects of *Apis mellifera* bee flour, on the metabolic health of mice. The main findings showed the potential of *Apis mellifera* bee meal in reducing hepatic steatosis in the body. Therefore, it is concluded that the inclusion of *Apis mellifera* insect meal in the diet generates beneficial effects on metabolic health.

Keywords: *Apis mellifera*. Entomophagy. Hepatic Steatosis. Insects. Metabolic Syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CC – Circunferência da Cintura
- DCV – Doença Cardiovascular Aterosclerótica
- DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
- DT2 – Diabetes Tipo 2
- GABA – *Gamma - Amino Butyric Acid*
- IMC – Índice de Massa Corporal
- NCEP ATP-III – *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel*
- NASH – Esteato-Hepatite Não Alcoólica
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PCR – Proteína Reativa
- PUFAs – Ácidos Graxos Poli-insaturados
- RCQ – Razão Cintura-Estatura
- SM – Síndrome Metabólica
- TAGs – Níveis Sanguíneos de Jejum de Triacilgliceróis
- TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética
- TGP – Transaminase Glutâmica Pirúvica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Síndrome metabólica e impacto à saúde.....	14
2.2	Ácidos graxos dietéticos e lipídios plasmáticos.....	16
2.3	Influência da alimentação nas doenças hepáticas.....	16
2.4	Importância da alimentação funcional nas doenças hepáticas.....	18
2.5	Consumo de insetos: <i>Apis mellifera</i>	19
2.6	Efeitos na promoção a saúde: <i>Apis mellifera</i>	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos.....	23
4	PRODUTOS CIENTÍFICOS	24
4.1	Produto 1 – Dietary supplementation with <i>Apis mellifera</i> bee whole meal flour reduces hepatic steatosis in obese mice.....	25
5	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO - Parecer fazer comissão de Ética e Pesquisa	49

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica é um termo usado para definir e destacar características que podem apresentar risco aumentado para doenças crônicas, dentre elas doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2. A obesidade e a resistência à insulina apresentam como doenças de base na maioria dos casos de síndrome metabólica, sendo necessário mais pesquisa para entender as interações dos genes com os fatores externos para melhor compreensão da fisiopatologia da síndrome metabólica (SAMSON; GARBER, 2014).

Algumas outras condições associadas a essa síndrome incluem inflamação, microalbuminúria, estado pró-trombótico, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a saber, esteato-hepatite não alcoólica (NASH). O diagnóstico precoce desta síndrome, bem como o tratamento e o monitoramento a longo prazo são essenciais para a prevenção da doença. O tratamento requer a introdução de mudanças no estilo de vida, com a implantação de novos hábitos, alimentação saudável e atividade física (CHAN; TONG; CRITCHLEY, 2002; PI-SUNYER, 2004).

Fatores de risco externos também competem para o desenvolvimento do quadro de síndrome metabólica como álcool, poluentes ambientais, drogas e irradiação, podendo induzir estresse oxidativo no fígado, que por sua vez transformam em doenças hepáticas, como a doença esteato-hepatite não alcoólica e hepática alcoólica. Muitos estudos são desenvolvidos sobre a busca por tratamento medicamentoso que apresente eficiência no tratamento da esteatose hepática, contudo os experimentos realizados não apresentaram comprovação de uma droga. Já a aplicação de antioxidantes tem sido uma estratégia racional para prevenir e curar doenças hepáticas que estejam relacionadas com estresse oxidativo (PI-SUNYER, 2004; LI, *et al.*, 2015; AGUILERA-MÉNDEZ, 2019).

Está comprovado que tanto nos aspectos quantitativos quanto qualitativos da alimentação ocorre a influência da deposição de triglicerídeos no fígado. Sendo que uma dieta rica em gordura e pobre em antioxidante é capaz de induzir esteatose hepática (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Atualmente, não existe diretrizes específicas relacionadas com alimentação para DHGNA, desta forma a busca por uma estratégia alimentar que atenda a necessidade de portadores da síndrome, baseia-se em resultados de experimentos (MCARTHY; RINNELLA, 2012).

Muitos tratamentos farmacológicos e crescentes pesquisas são propostos para o tratamento da DHGNA, contudo, nenhum tem demonstrado segurança e eficácia significativa a longo prazo. No entanto, os compostos bioativos e suplementos naturais, tanto de origem

vegetal quanto animal, têm se tornado em alimentação alternativa e fontes de benefícios à saúde.

A melhora no metabolismo foi apresentada em modelos experimentais de DHGNA nas diferentes características histopatológicas e bioquímicas da DHGNA (SALOMONE; GODOS; ZELBER-SAGI, 2015). A criação de abelhas há muitos anos, serve como fonte de alimento para humanos em países diferentes e são uma boa fonte de aminoácidos essenciais, embora ainda sejam limitados os estudos quanto a sua composição nutricional (MEKURIA *et al.*, 2021).

Os produtos originários de abelhas melífera, bem como o inseto propriamente dito, têm sido utilizados como suplementos complementares da alimentação ao longo dos anos. Estudo vêm comprovando efeitos benéficos à saúde associados à ingestão do inseto em suas mais variadas formas, como farinhas, consumo de larvas, extratos entre outros. Esses mesmos, exercem efeito modulador e protetor no tratamento de muitas doenças (KAGEYAMA *et al.*, 2018). Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inclusão alimentar da farinha de *Apis mellifera* no metabolismo de camundongos portadores de esteatose hepática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome metabólica e o impacto à saúde

A síndrome metabólica (SM) está se tornando um grave problema de saúde pública global. A síndrome metabólica é um agrupamento dos principais fatores de risco cardiovascular e inclui obesidade abdominal, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão em um indivíduo. É uma desordem complexa representada por um conjunto de fatores de risco cardiovascular que são comumente associados à adiposidade central e resistência à insulina. A magnitude da síndrome metabólica nos países em desenvolvimento vem aumentando, devido à epidemia global de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005; ALBERTI *et al.*, 2009).

Os distúrbios metabólicos da SM aumentam o risco de DCV. Existe uma associação linear entre SM e fatores de risco para DCV, como hipertensão, dislipidemia, hiperglicemia, disfunção endotelial e hiperatividade plaquetária (KAUR; KAUR; SINGH, 2018; O'KENNEDY; RAEDERSTORFF; DUTTARROY, 2017; RUSSO, 2012). Indivíduos com SM têm um risco três vezes maior de desenvolver DCV e carregam uma suscetibilidade duas vezes maior para mortalidade cardiovascular do que indivíduos saudáveis (YOUNIS *et al.*, 2016).

Com base na conhecida relação entre a quantidade total de adiposidade corporal, sua distribuição e seus efeitos fisiopatológicos no sistema cardiometabólico, os preditores substitutos mais utilizados da SM em nível clínico são os parâmetros antropométricos clássicos de adiposidade geral e central, como índice de massa corporal (IMC), circunferência da cintura (CC), relação cintura-quadril (RCQ) e razão cintura-estatura. A presença dos níveis aumentados desses parâmetros citados anteriormente em um indivíduo é definida como SM pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

No entanto, de acordo com os critérios do *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel* (NCEP ATP-III), a SM considera contribuir para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) se o indivíduo tiver pelo menos 3 ou mais das seguintes condições, como obesidade central (circunferência da cintura >102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres); níveis sanguíneos de jejum de triacilgliceróis (TAGs) ≥ 150 mg/dL e colesterol de alta densidade (HDL-C) ≤ 40 mg/dL; nível de glicose no sangue ≥ 100 mg/dL e pressão arterial ≥ 130 mmHg/ ≥ 85 mmHg (GRUNDY *et al.*, 2005). Além disso, níveis elevados de proteína creatina de alta sensibilidade (PCR), condições trombóticas aprimoradas,

microalbuminúria, disfunção endotelial e níveis aumentados de inflamação estão associados à SM (DEVARAJ; ROSENSON; JIALAL, 2004; VU *et al.*, 2005).

Dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), mostram que o Brasil, país em desenvolvimento, tem estimativas crescentes de sobrepeso e obesidade até o ano de 2030, o que pode aumentar os riscos de desenvolvimento de SM (PHILLIPS, 2016). Além da obesidade, características como idade, dieta inadequada, sexo, sedentarismo, localização geográfica e condição socioeconômica são fatores que influenciam a prevalência da SM (BARIK *et al.*, 2018; CUSCHIERI *et al.*, 2017).

Até o ano de 2030 estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população mundial tenha SM (IDF, 2006). Nos países em desenvolvimento, especialmente na América do Sul, as rápidas transições socioeconômicas e demográficas promoveram grandes aumentos nas taxas de obesidade, estilo de vida sedentário, bem como profundas mudanças nos padrões alimentares (ABALLAY *et al.*, 2013). Estudos realizados em países da América Latina como Chile, Colômbia, México, Peru e Venezuela mostraram alta prevalência de SM, variando de 12,3% a 42,7% (MUJICA *et al.*, 2008; FLOREZ *et al.*, 2005). No Brasil, segundo revisão sistemática de 2013, a prevalência média ponderada de SM foi de 29,6% (variação: 14,9% e 65,3%) (DE CARVALHO VIDIGAL *et al.*, 2013).

Diferentes definições de SM foram propostas até o momento e, portanto, as estimativas de prevalência podem variar substancialmente entre as populações, dependendo não apenas de suas características, mas principalmente dos critérios de diagnósticos aplicados. As definições mais usadas foram produzidas pelo *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP) em 2001, que foi atualizado em 2005 pela *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute* (Modified NCEP) (GRUNDY *et al.*, 2005) e a Federação Internacional de Diabetes (IDF) (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005).

Dadas as evidências disponíveis, há uma necessidade premente, tanto da saúde pública quanto dos domínios clínicos, de abordar essa questão. Do ponto de vista da saúde pública, esforços focados precisam ser feitos para promover modificações no estilo de vida da população em geral para reduzir a obesidade e aumentar a atividade física. Além disso, os indivíduos com SM precisam ser identificados e educados com vistas a reduzir seus fatores de risco de estilo de vida aliados a tratamento específico, quando necessário. Intervenções dietéticas podem induzir alterações nesse estado metabólico e inflamatório, modulando a expressão de genes importantes envolvidos nessas manifestações crônicas (CUSCHIERI *et al.*, 2017).

2.2 Ácidos graxos dietéticos e lipídios plasmáticos

As anormalidades no metabolismo de lipídios e lipoproteínas na síndrome metabólica são explicadas principalmente pelo aumento da adiposidade, resistência à insulina e alterações nos fatores de transcrição inerentes à lipogênese e à lipólise, tanto no fígado quanto no tecido adiposo. Várias dessas condições são consequência da quantidade e qualidade da gordura alimentar. Embora padrões semelhantes das respostas dos lipídios do sangue aos ácidos graxos alimentares possam ser identificados, uma variação individual considerável é frequentemente observada, embora isso ainda não tenha sido explicado (RIOUX; LEGRAND, 2007).

Os recentes avanços na nutrigenômica provavelmente explicaram os achados clínicos e epidemiológicos envolvidos nessas respostas dietéticas individuais às gorduras. Os ácidos graxos da dieta são geralmente classificados de acordo com parâmetros que têm significado biológico, como o número e a posição das ligações duplas, o comprimento da cadeia de carbono e sua posição na fração glicerol. Apesar da semelhança entre os ácidos graxos, diferenças sutis na estrutura podem induzir diferenças relevantes nas respostas metabólicas envolvidas no metabolismo de lipídios plasmáticos e lipoproteínas (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2005).

O tratamento da SM e a prevenção de suas comorbidades associadas é um tema de destaque e de extrema importância nos dias atuais, uma vez que a SM pode ser tratada com fármacos de cada componente, contudo as pesquisas atuais estão focadas em tratamentos holísticos, como aqueles relacionados ao estilo de vida. A atividade física e a ingestão alimentar saudável demonstraram muitos efeitos benéficos no tratamento da SM e na prevenção de comorbidades. Neste contexto, opções alimentares saudáveis tornam-se aliados à saúde humana.

2.3 Influência da alimentação nas doenças hepáticas

O fígado desempenha um papel central no metabolismo nutricional, incluindo a homeostase da glicose, síntese de proteínas e metabolismo de drogas/toxinas. O metabolismo nutricional pode ser reduzido em pacientes com doença hepática crônica e pode piorar à medida que a doença hepática progride para cirrose (CHEUNG; LEE; RAMAN, 2012). Em pacientes com doença hepática relacionada ao álcool, deficiências de macronutrientes e micronutrientes são comuns. Para pacientes com cirrose, desnutrição e sarcopenia são observadas em 50% a 90% dos pacientes e estão associadas à uma infinidade de desfechos, incluindo maior mortalidade, descompensação hepática e redução da qualidade de vida (LAI *et al.*, 2021). No

outro extremo do espectro, dietas altamente calóricas ricas em carboidratos e gorduras em excesso levam ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (BARRERA; GEORGE, 2014).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida como uma doença progressiva, que inclui um espectro de alterações gordurosas hepáticas que variam de esteatose simples a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) com ou sem fibrose e cirrose e carcinoma hepatocelular (RINELLA, 2015). À medida que a incidência de obesidade aumenta, a DHGNA se tornou a principal causa da doença hepática crônica atual, com uma alta taxa de incidência de até 25% em todo o mundo (YOUNOSSI *et al.*, 2016).

O manejo usual da DHGNA inclui aconselhamento de estilo de vida para obter uma redução gradual de peso e um aumento na atividade física. Os pacientes são encorajados a perder $\geq 8\%$ do seu peso corporal. Uma intervenção intensiva no estilo de vida focada na dieta, exercícios e modificação de comportamento com uma meta de redução de peso de 7 a 10% que leva a uma melhora significativa na histologia do fígado em pacientes com DHGNA (PROMRAT *et al.*, 2010). De fato, a perda de peso melhora a esteatose, reduz a inflamação hepática e a lesão hepatocelular e melhora o perfil de risco cardiovascular (SULLIVAN *et al.*, 2012).

No entanto, a perda de peso por meio da restrição de energia é difícil de alcançar e sustentar. A atividade física e o exercício também diminuem efetivamente a esteatose. Estudos transversais e prospectivos mostraram que a atividade física diminui os lipídios intra-hepáticos (GEORGE *et al.*, 2009; PERSEGHIN *et al.*, 2007). Tanto os exercícios aeróbicos quanto os de resistência demonstraram melhorar a função hepática, independentemente da perda de peso (HALLSWORTH *et al.*, 2011).

Além da ingestão total de energia, a composição da dieta também afeta as funções metabólicas, endócrinas e o balanço energético geral. A maioria das recomendações incentiva o consumo de dietas ricas em frutas e vegetais para prevenção de doenças crônicas, e a DHGNA não é exceção. Tais dietas forneceriam uma quantidade significativa de componentes bioativos com efeitos benéficos conhecidos devido em parte às propriedades anti-inflamatórias (MUSSO *et al.*, 2003). As recomendações gerais incluem uma redução na ingestão de gordura total, ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e frutose. De fato, a alta ingestão de frutose tem sido associada ao aumento do risco de DHGNA e danos ao fígado (CHIU *et al.*, 2014; VOS; LAVINE, 2013). A frutose dietética (consumida na forma de refrigerantes) tem sido implicada na patogênese da DHGNA (MA *et al.*, 2015).

Camundongos com acesso *ad libitum* à solução de frutose mostraram níveis significativamente maiores de acúmulo de lipídios hepáticos, peroxidação lipídica e níveis de endotoxina no sangue portal em comparação com controles e camundongos alimentados com solução de glicose. Por outro lado, é aconselhável um aumento na ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e ácidos graxos monoinsaturados. Além disso, há recomendação para incluir ácidos graxos n-3 de cadeia longa para reduzir o risco de DHGNA (BERGHEIM *et al.*, 2008).

De fato, a dieta de pacientes com DHGNA é geralmente rica em gordura saturada e colesterol, enquanto é pobre em gordura poli-insaturada, fibras e vitaminas antioxidantes C e E (MUSSO *et al.*, 2003). Além de um desequilíbrio na ingestão de gordura, maiores chances de inflamação foram associadas a maior ingestão de carboidratos em pacientes com DHGNA (TOSHIMITSU *et al.*, 2007).

2.4 Importância da alimentação funcional nas doenças hepáticas

Estudos têm comprovado que os compostos bioativos presentes em fontes alimentícias naturais são os principais ingredientes funcionais para prevenção de doenças crônicas com muitas evidências científicas, sendo ainda utilizados para desenvolvimento de suplementos, alimentos funcionais, nutracêuticos, com o objetivo de serem utilizados no tratamento e prevenção dessas doenças (MA *et al.*, 2018).

Os alimentos funcionais e nutracêuticos com características hipolipidêmicas, auxiliam na melhora do perfil lipídico no sangue, reduzindo os triglicerídeos, o colesterol das lipoproteínas de baixa densidade, elevando o colesterol das lipoproteínas de alta densidade. A eficácia dos compostos presentes em fontes vegetais e animais como, ômega-3, ácido graxo, fitoesteróis, e a variedade de fibras alimentares, fica comprovado através dos estudos atualmente realizados (MA *et al.*, 2015).

As substâncias presentes nos alimentos funcionais, baseados na integração e sua composição contida na dieta habitual da população, mostraram-se eficazes na redução do risco de dislipidemia. Portanto, esses componentes funcionais mostraram-se um auxílio valioso no tratamento e na prevenção de doenças crônicas, bem como em distúrbios metabólicos (LANGELLA *et al.*, 2014). A ação dos alimentos funcionais nas doenças hepáticas tem se tornado objeto de estudo, quando relacionado os benefícios para o tratamento de doenças ao estresse oxidativo, processo comum no desenvolvimento da doença. No entanto, os efeitos dos alimentos funcionais na lesão hepática induzida por síndrome metabólica, carecem de mais

estudos (ZHANG *et al.*, 2019).

Experimentos realizados em camundongos, tem apresentado resultados satisfatórios quanto ao uso de alimentos funcionais que contém compostos que agem diretamente em doenças hepáticas, entre elas a esteatose hepática, e tenderam a melhorar a progressão da NASH em indivíduos humanos com comprovação através de exames clínicos e biópsia. Esses resultados sugerem que o uso de alimentos funcionais, bem como, dos compostos bioativos pode vir a se tornar um tratamento promissor para NASH, contribuindo para melhora da inflamação hepática (NI *et al.*, 2015).

Atualmente, não existe comprovação de medicamentos aprovados e que tratam de forma específica a DHGNA, sendo que o tratamento mais comum baseia-se no melhoramento do estilo de vida. No entanto, alguns nutracêuticos apresentam características favoráveis e podem contribuir para a melhora no tratamento do acúmulo de gordura no fígado, nos parâmetros bioquímicos, antropométricos, relativos ao fígado. Há ainda uma relação de poucas moléculas nutracêuticas que foram avaliadas por seus efeitos na NASH (CICERO; COLLETTI; BELLENTANI, 2018).

Os alimentos funcionais possuem alto valor nutricional e em sua composição estão presentes os compostos bioativos e fitoquímicos que possuem atividade antioxidante e antitumoral que impactam diretamente a saúde. Além disso, o desenvolvimento de novos alimentos, a partir dos benefícios à saúde e com o empreendimento de novas tecnologias como a nanoencapsulação de constituintes bioativos, fornece novas descobertas para tratamento de doenças hepáticas, bem como doenças tumorais (CROITORU *et al.*, 2019). Nesse sentido, é urgente e necessário estudos que objetivam elucidar o efeito de estratégias nutricionais e dietéticas, e os mecanismos de ação de alimentos funcionais específicos (DONGIOVANNI *et al.*, 2016).

2.5 Consumo de insetos: *Apis mellifera*

Nos últimos anos tem aumentado a exigência e a necessidade cada vez maior de estratégias alimentares que forneçam alimentos de qualidade, adequados, seguros e nutritivos que estejam disponíveis e acessíveis a todas as pessoas em todos os momentos. A proposta de combater à deficiência de proteínas em alguns países subdesenvolvidos, apresenta o consumo de insetos como perspectivas futuras para alimentação humana (VANQA; MSHAYISA; BASITERE, 2022).

O consumo de insetos comestíveis tem-se concentrado em larvas e farinhas produzidas

com insetos em suas mais variadas fases. As farinhas de insetos possuem um valor nutricional semelhante ou maior do que muitas fontes alimentícias convencionais. O teor de proteína da farinha de insetos a base de larvas chega aproximadamente 50% do peso seco, enquanto o teor de gordura apresenta valor próximo a 30% do peso seco. A produção da farinha envolve os mais diferentes métodos como cozimento, secagem, moagem, atentando também para os aspectos organolépticos (ELHASSAN *et al.*, 2019).

As abelhas estão se tornando uma importante fonte alimentícia para o consumo humano, sendo que, a forma de consumo varia desde a forma de larva e pupa até a fase adulta. As abelhas adultas comestíveis, excedem o valor nutricional em comparação as larvas que são consideradas uma iguaria, no entanto as adultas são mais difíceis de capturar, devido a isso apresenta um alto valor de mercado (MOZHUI *et al.*, 2020). A criação de abelhas *Apis mellifera* é uma prática cultural comum em regiões tão diversas como Senegal, Zâmbia, Austrália, México, Equador, China, Tailândia (JENSEN *et al.*, 2015).

Estudos apresentam a composição nutricional de larvas, pupas e adultos da abelha *Apis mellifera*, contendo maiores quantidades de aminoácidos, ácidos graxos e metais quando comparados com fontes alimentícias convencionais de origem vegetal e animal. Outros estudos mostraram ainda que à medida que as larvas evoluem no crescimento, os teores de gorduras e carboidratos diminuem de 14,5% e 46,1% para 6,9% e 30,6%, respectivamente, ao contrário da proteína que tem seus teores aumentados de 35,3 para 51%. Devido seu alto teor de proteína, as abelhas em todos os períodos de desenvolvimento representam ser um alimento ideal, pela composição equilibrada, de nutrientes e minerais (GHOSH; JUNG; MEYER-ROCHOW, 2016).

As pupas e abelhas adultas apresentam em sua composição alto valor nutricional, tornando-os um alimento propício para o consumo humano, enquanto a fase de larva também chamada de pupa inicial, pode ser recomendada como alimento funcional, por promover benefícios à saúde, contudo, estudos e análises da abelha na fase adulta exibiram maior atividade antioxidante (KOUŘIMSKÁ; ADÁMKOVÁ, 2016).

A criação de abelhas *Apis mellifera* é uma prática cultural comum em regiões tão diversas como Senegal, Zâmbia, Austrália, México, Equador, China, Tailândia (JENSEN *et al.*, 2015). A base genética da espécie de abelha *Apis mellifera* é pouco estudada, embora tenha grande importância e diversidade. Existem três subgêneros de abelhas mais conhecidos pela diferenciação genômica, a saber, *Apis florea*, *Apis dorsata* e *Apis mellifera*. A diferenciação dentro da *Apis* é observada desde os aspectos da seleção de vários genes, para adaptações específicas da linhagem, imunidade, comportamento de nidificação e migração (FOUKS *et al.*,

2021).

Apesar do consumo de abelhas como alimento ser uma prática comum em várias partes do mundo, o potencial nutricional desse alimento se manteve inexplorado por muito tempo. Estudos foram desenvolvidos com o objetivo de explorar a qualidade dos nutrientes dessa fonte de alimento. O consumo de abelhas é recomendado como um alimento alternativo e nutritivo para humanos (especialmente na fase final de pupa e na fase adulta), pois contém uma grande quantidade dos aminoácidos essenciais, que são necessários aos humanos (GHOSH *et al.*, 2021).

2.6 Efeitos na promoção da saúde: *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* na fase larval e na fase adulta, são uma excelente fonte de nutrição com alto teor de proteína, visto que, a ninhada da abelha *Apis* são seguramente um complemento alimentar que agrega valores à saúde humana. Avaliando resultados e estudos que analisam as fases de desenvolvimento da abelha *Apis mellifera*, fica comprovado que a abelha adulta pode ser a melhor fonte nutricional entre os estágios de desenvolvimento (GHOSH; JUNG; MEYER-ROCHOW, 2016).

Além disso, as larvas e pupas apresentaram características organolépticas que auxiliam na melhora da palatabilidade, considerando dentre muitas características o cheiro agradável que, favorece a indústria na pesquisa e desenvolvimento de fontes alimentícias baseados em insetos comestíveis, como abelhas, combinando os aromas de maior aceitação para alimentos (HABER *et al.*, 2019). O setor da indústria, a exemplo da Índia, tem optado incluir insetos na busca de alimentação alternativa, principalmente a apicultura, não só pela opção de ser um alimento com alta quantidade de proteína, mas também pelo vasto potencial de produção de benefícios à saúde (GHOSH *et al.*, 2021).

A alimentação a partir da abelha (*Apis mellifera*) é composta por nutrientes essenciais para a nutrição humana, podendo ser usada para desenvolver alimentos complementares nutricionalmente adequados, apresentando segurança microbiológica e com condições sensoriais aceitáveis, podendo ser ofertado em um nível de comparação com os alimentos convencionais à base de cereais que promovem benefícios à saúde (MEKURIA *et al.*, 2021).

Estudos recentes com extratos e pó de larva de abelhas *Apis mellifera* apresentaram resultados com grande impacto na saúde, uma vez que, os dados experimentais comprovaram o aumento de células de defesa e macrófagos no sangue de modelos experimentais, apontando para um alimento funcional promissor com potencial para uso como imomoduladores no

tratamento clínico (LI *et al.*, 2020).

As substâncias produzidas pelas abelhas *Apis mellifera*, possuem efeitos considerados eficientes na redução da glicemia e apresentam-se ainda como fonte de alimento natural de moléculas bioativas para futuros tratamentos alternativos de hiperglicemia e disfunção hepática, uma vez que foi analisado o fígado de animais que passaram pelo processo de indução da diabetes, mostrando o efeito antioxidante desse alimento (BAKOUR *et al.*, 2021).

Estudo que visa explorar os efeitos benéficos na saúde humana através do pó liofilizado de larva de abelha em distúrbios de neurotransmissores que têm relação com insônia e trato gastrointestinal, determinaram que houve melhora nos sintomas de insônia e regulação do neurotransmissor GABA (*Gamma – Amino Butyric Acid*) responsável pela inibição do sistema nervoso central dos mamíferos adultos. A pesquisa avaliou ainda se essa melhora está relacionada à melhora na microbiota intestinal. Portanto, o pó liofilizado de abelha, entre outros produtos como a farinha, pode ter aplicações potenciais no tratamento de doenças crônicas, sendo que mais estudos devem ser realizados para exploração do pó de abelha como alimento funcional (TANG *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da farinha integral de *Apis mellifera* sobre o metabolismo de camundongos obesos induzidos por dieta, apresentando esteatose hepática.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e mensurar os níveis de TGO e TGP;
- Analisar mudanças histológicas no tecido hepático quanto à redução/aumento de tamanho, peso, deposição de gordura e possíveis efeitos adversos decorrentes do tratamento;
- Investigar os efeitos da farinha de abelha *Apis mellifera* sobre expressão de genes relacionados a lipogênese e estresse oxidativo.

4. PRODUTOS CIENTÍFICOS

Produto 1: Dietary supplementation with *Apis mellifera* bee whole meal flour reduces hepatic steatosis in obese mice

Dietary supplementation with *Apis mellifera* bee whole meal flour reduces hepatic steatosis in obese mice

Aline Lopes Nascimento^a, Joyce Hellyen Santos Pereira^b, Bruna Viana Caldas^a, Victor Hugo Dantas Guimarães^b, Alfredo Mauricio Batista de Paula^b, André Luiz Sena Guimarães^b, Ulisses Alves Pereira^a, Sérgio Henrique Sousa Santos^{a,b*}

^a Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^b Laboratório de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Minas Gerais, Brasil.

Aline Lopes Nascimento: alinelopesnutri@yahoo.com; Joyce Hellyen Santos Pereira: jhellyen@gmail.com; Bruna Viana Caldas: caldas.brun@gmail.com; Victor Hugo Dantas Guimarães: victorhg23354@hotmail.com; Alfredo Maurício Batista de Paula: ambpatogi@gmail.com; André Luiz Sena Guimarães: andreluizguimaraes@gmail.com; Ulisses Alves Pereira: ulisses_ap@yahoo.com.br; Sérgio Henrique Sousa Santos: sergiosousas@hotmail.com.

*Correspondência para Sérgio Henrique Sousa Santos, Instituto de Ciências Agrárias. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Avenida Universitária, 1.000 – Universitário, 39.404-547, Montes Claros, MG, Brasil. E-mail: sergiosousas@hotmail.com.

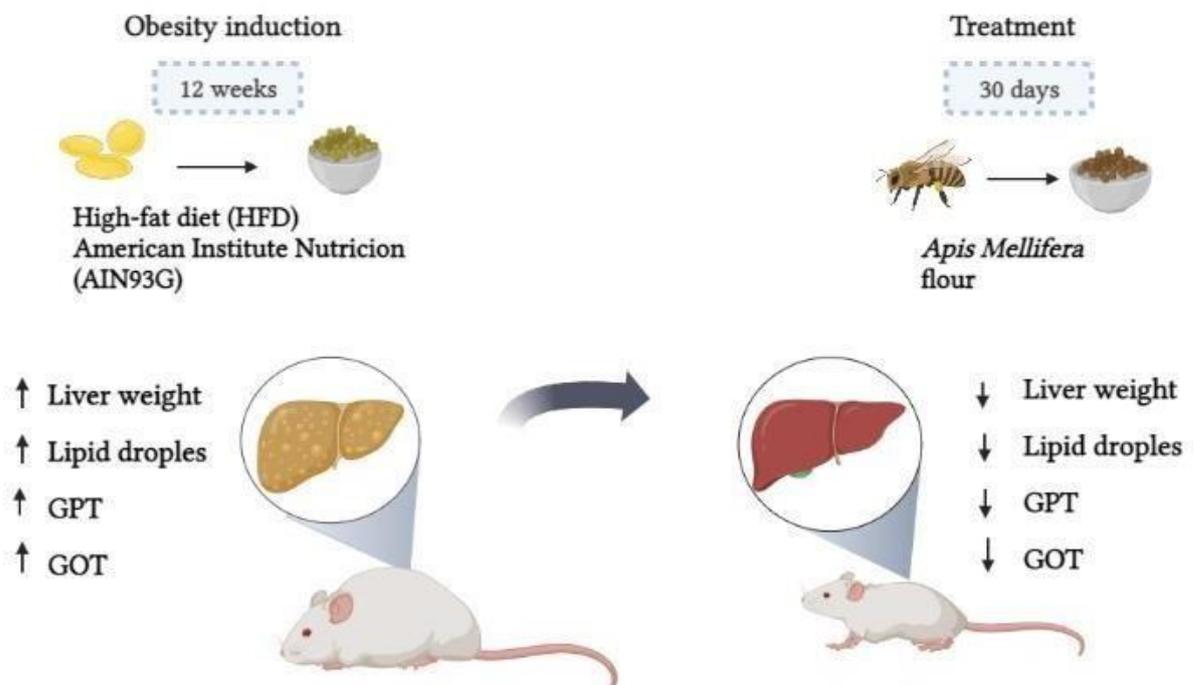
ABSTRACT

Background: chronic diseases related to metabolism are becoming an epidemic in the world. The scarcity of food of high nutritional and functional value has encouraged the practice of insect consumption (entomophagy). Objective: To evaluate the effect of dietary supplementation of *Apis mellifera* bee whole meal flour on the metabolism of diet-induced obese mice. Methods: Male Swiss mice were divided into 6 groups treated for 4 weeks as follows: standard diet (AIN93G), standard diet + 15% *Apis mellifera* bee meal, standard diet + 30% *Apis mellifera* bee meal, diet (HFD), and hyperlipidic diet, hyperlipidic diet (HFD) + 15% *Apis mellifera* bee whole meal flour, hyperlipidic diet (HFD) + 30% *Apis mellifera* bee meal. Various parameters such as feeding/energy, body weight, liver histology tissue weight, liver

and mRNA expression intake were evaluated. Results: The main results showed that the inclusion of *Apis mellifera* bee meal induced body weight loss, reduced hepatic steatosis, changes in biochemical and histological parameters. Moreover, significant changes were also observed in the expression of lipogenic gene PPAR α , SREBP1c, GPX4. Conclusions: The main findings showed the potential use of *Apis mellifera* bee whole meal flour in the improvement of hepatic steatosis and beneficial effects in metabolic diseases.

Keywords: Metabolic Syndrome, Hepatic Steatosis, Diet, Edible Insects, *Apis mellifera*.

Graphical Abstract



List of abbreviations

AST/GOT, alanine transaminases; ALT/GPT, aspartate; AP, *Apis mellifera*; BW, body weight; FFA, free fatty acid; AIN93G, standard diet; AIN93G +F15, diet + 15% *Apis mellifera* bee meal, AIN93G+F30 diet + 30% *Apis mellifera* bee meal; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acids; GPX4, glutathione peroxidase; HFD, hyperlipidic diet; HFD+F15, hypercaloric diet +15% *Apis mellifera* bee meal, HFD + F30, hypercaloric diet + 30% *Apis mellifera* bee meal; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; qRT-PCR, quantitative real-time reverse transcriptase PCR; SREBP-1, sterol regulatory element-binding protein-1; WHO, World Health Organization.

1. Introduction

As defined by the World Health Organization (WHO), the metabolic syndrome (MS) is a sum of inflammatory diseases characterized by dyslipidemia, whose risk factors are related to obesity (YANG *et al.*, 2021). Free fatty acids (FFA) are energy molecules that play an important role in metabolism. However, excess free fatty acids that convert into calories are stored as triglycerides (FFA and glycerol) in adipocytes (ZENG *et al.*, 2020). Chronic diseases related to metabolism are turning into an epidemic disease putting public health at risk in a global view, such as: type 2 diabetes mellitus (DM2), obesity and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (NAFLD) (SONG *et al.*, 2022).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered the most common liver disease in the world, when compared to simple liver steatosis, in chronic state it can progress to liver fibrosis, cirrhosis, liver transplantation and death (MENDES *et al.*, 2021). Oxidative stress is considered to be the main mechanism of liver damage and disease progression (NAFLD), associated with poor diet, sedentary lifestyle and other external factors (CAI *et al.*, 2020). The search for improved lifestyle, adherence to healthy habits, including weight loss and structured exercise remains the master key to the treatment and prevention of disease (ZENG *et al.*, 2020).

Many studies have used experimental model systems to examine natural product substances such as bioactive compounds, proteins, carbohydrates dietary fibers, lipids and vitamins for their apparent health benefits against NAFLD (BICALHO *et al.*, 2021). Other studies support the understanding that in order to have a synergistic effect, lifestyle interventions, must be associated with so-called functional foods (ZHAO *et al.*, 2021).

The scarcity of food with high nutritional and functional value has encouraged the practice of insect consumption (entomophagy). In Africa, insects are an important source of food and provide food security. Among the most consumed insects on this continent and in the world are: Coleoptera (beetles), Isoptera (termites), Diptera (flies) and increasing consumption of Hymenoptera (ants, bees and wasps) (LANGE; NAKAMURA, 2021; MEKURIA *et al.*, 2022).

Among the edible insects, bee larvae (*Apis mellifera*) have high nutritional content and promote health benefits. Studies developed in mice to evaluate the effects of consumption of bee powder and extract, showed through experiments, the potential of bee food in immunomodulatory and anti-inflammatory activities (LI *et al.*, 2020; AYLANC *et al.*, 2021). Within this context the hypothesis of this study was to evaluate the effect of adding bee whole meal flour in the liver of mice with the induction of hepatic steatosis.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

The experiment was performed with 36 6-week-old male Swiss mice, bred at the bioterium of the Montes Claros State University. In each cage, 6 mice were kept under controlled conditions (12-hour light and dark cycle, temperature $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, and free access to food and water during treatment).

All procedures were in accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation and Welfare of the University of Montes Claros (UNIMONTES), according to protocol number 224/2021 (RICE, 1980).

2.2 Experimental diets

The animals were divided into 6 groups (n= 6 each), comprising the following groups: Standard diet (AIN93G); Standard diet + 15% *Apis mellifera* bee meal (AIN93G+15); Standard diet + 30% *Apis mellifera* bee meal (AIN93G + 30); High fat diet (HFD); High fat diet + 15% *Apis mellifera* bee meal (HFD + F15) and High fat diet + 30% *Apis mellifera* bee meal (HFD+F30) (GUIMARÃES *et al.*, 2020). The standard group received a standard rodent diet and the obese induced group received hyperlipidic diet (GUIMARÃES *et al.*, 2020). The inclusion of *Apis mellifera* was 15% and 30% of the diet, so that the composition of all diets in the obese group was isocaloric with similar amount of macronutrients (protein, lipids and carbohydrates).

2.3 Bromatological analysis

The insects (*Apis mellifera*) in the adult phase, were purchased from the company Apiário Terra Nova, Montes Claros-MG and refrigerated dried later in SSD CR oven at a temperature of 60°C programmed for 24h (GESSNER *et al.*, 2019). After being ground in an electric screw meat grinder (Botini 1/3cv, Brazil), the flour was homogenized and after the moisture test was taken from a dry sample for laboratory analysis, in the veterinary laboratory Faro Lab (COMPEDIUM, 2009).

2.4 Obesity inductions

The hyperlipidic diet for obesity induction was *ad libitum*, with lower percentage of carbohydrates and lipids, which in large quantities interfere with the development of metabolic changes and mimic human nutrition, unlike other studies (GUIMARÃES *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021). After the period of 3 months, the groups that went through the process of induction of obesity were divided into control and treatment groups, receiving daily doses of fractionated flour (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

2.5 Measurement of body weight and food consumption

The food intake and weight of the mice were measured twice a week throughout the treatment, calculating the food efficiency (food intake/body weight - BW). Body weight and food intake were monitored twice a week on previously defined days and times, using a 0.001g digital analytical scale (Toledo®, Brazil). The body weight of the animal was measured individually during the experiment period and the average feed intake per animal was obtained in grams and Kcal corrected by weight. At the end of the experiment, the animals went through the overnight fasting procedure (12h) and were killed by decapitation. Samples were collected, weighed and analyzed in liquid reagents, and stored at -80 °C for later analysis.

2.6 Histopathological Analysis

Serum was obtained after centrifugation for lesion biochemistry analysis (3200 rpm for 10 min at 4 °C). The enzymes alanine transaminases (AST/GOT) and aspartatotransferase (ALT/GPT) were dosed using enzyme kits (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) (ANDRADE *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2021).

2.7 Real-time registered PCR

Total RNA was extracted from the liver with Trizol reagent. RNA was treated with DNase and using MMLV reverse transcribed. Endogenous glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a cleanup control. The RNA samples were amplified using specificity primers and SYBR Green reagents (Applied Biosystems®, USA) on the Plus One platform (Applied Biosystems®). Relative gene expression was expressed as relative RNA

level with a control and was proved after normalization to GAPDH following method $2^{-\Delta\Delta CT}$. CT value was presented as average of duplicate measurements (SOUSA *et al.*, 2021). Primer sequence used in the study (Table 1).

Table 1. Sequence primers.

Primer target	Primer sequences (5' 3')		NM
GAPDH	F	AAG AAG GTG AAG CAG GCA TC	NM_008084
	R	CGA AGG TGG AAG AGT GGG AGT TG	
PPAR γ	F	AGGAAAGACAACGGACAAATCACC	NM_011146
	R	ATTCGGATGGCCACCTTTGC	
SRBP1c	F	TGC GTG GTT TCC AAC ATG AC	NM_008043
	R	CCT CAT GTA GGA ATA CCC TCC TCA TA	
GPX4	F	TGTGTGCATCCCGC GATGATTG	NM_008162
	R	CCTTGGCTGAGAATTCGT GCATGG	

2.8 Histology

As liver tissue samples were fixed in formaldehyde solution (10%), serially sectioned at 5 μ m, emerged on parafina as conventional slides and hematoxylin and eosin stained, and captured, in Japan, (SlidesX10®) Images were captured paying attention to public areas (x 20 objective lens). Samples were examined using an Olympus FSX100 optical microscope (LI *et al.*, 2022; YIN *et al.*, 2010).

2.9 Data Analysis

A statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software (version 5.0®, San Diego, California, USA), with 95% ($p < 0.05$) confidence. Data were given as mean \pm standard error (SE). Data are presented as mean \pm standard error (SE). Statistical differences were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). Histological analysis and the effects of bee meal were verified by quantitative analysis, followed by multiple Bonferroni test and the T-test.

3. Results

3.1 Liver

In the evaluation of liver weight, the AIN93G (0.04 ± 0.04 g/BW), AIN93G+F15 (0.04 ± 0.00 g/BW) and AIN93G + F30 (0.04 ± 0.00 g/BW) groups demonstrate that the HFD + F15 (0.04 ± 0.00 g/BW) group showed a significant reduction compared to the HFD (0.05 ± 0.00 g/BW) group ($p < 0.05$ g/BW) and a reduction in HFD + F30 (0.04 ± 0.00 g/BW), mice fed a hypercaloric diet (Fig. 1B).

3.2 Liver Analysis

To evaluate the effects of *Apis mellifera* meal on serum transaminases, GPT, GOT and GPT/GOT ratio were tested, as shown in (Fig. 2 C). For the evaluation of the effects on systemic organs, the liver was chosen because it is a vascularized organ that favors the observation of various metabolic alterations. GOT levels tended to decrease in the AIN93G + 15 (14.29 ± 1.86 U/L) and AIN93G + 30 (13.71 ± 1.75 U/L) treated groups when compared to their control AIN93G (19.17 ± 2.72 U/L). Whereas HFD + 15 group (12.86 ± 2.13 U/L) showed significant reduction when compared to HFD group (23.50 ± 1.47 U/L) ($p < 0.01$) and HFD+30 (17.14 ± 1.35 U/L) ($p < 0.01$) as shown in (Fig. 2 A). The liver data for the evaluation of transaminases showed a trend of reduction of the AIN93G (91.50 ± 13.01 U/L) and AIN93G + 30 (95.67 ± 7.18 U/L) groups; when compared to the AIN93G + F15 group (99.50 ± 13.98 U/L). However, HFD + 15 group (65.50 ± 10.47 U/L) showed reduction differing statistically from HFD group (65.50 ± 10.47 U/L) ($p < 0.01$) and HFD + 30 group (97.33 ± 11.09 U/L), for TGP levels, presented in (Fig. 2B). GOT/GPT ratio was reduced in AIN93G + 15 (0.10 ± 0.01 U/L) and AIN93G + 30 (0.12 ± 0.01 U/L) when compared to its control group AIN93G (0.14 ± 0.02 U/L) and showed significant reduction in HFD + 15 (0.16 ± 0.03 U/L) ($p < 0.05$) group compared to its control group HFD (0.27 ± 0.02 U/L) and trend of reduction compared to HFD + 30 (0.15 ± 0.01 U/L) group ($p < 0.05$) depicted in (Fig. 2 C).

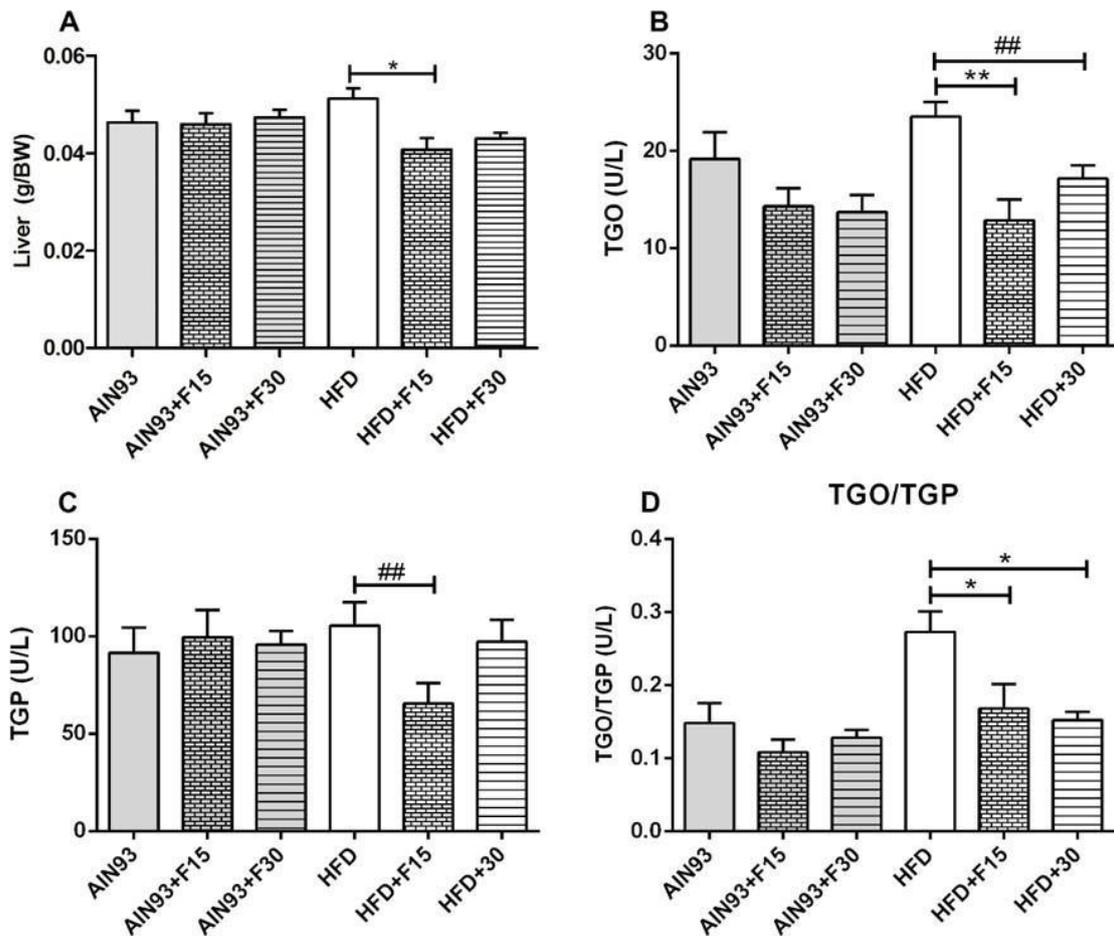


Figure A) Liver weight; * $p < 0.05$; ANOVA; BW; AIN93G: standard diet; AIN93G + F15: standard diet with 15% *Apis mellifera* meal; AIN93G + F30: standard with 30% *Apis mellifera* meal; HFD diet: hypercaloric diet; HFD + F15: hypercaloric diet with 15% *Apis mellifera* meal; HFD + F30: hypercaloric diet with 30% *Apis mellifera* meal. Biochemical profile of mice fed standard and hyperlipidic diets. B) TGO/ALT levels. C) GPT/AST levels. D) TGO/GPT ratio (U/L). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA ## $p < 0.01$ T-test; TGO/AST: aspartate aminotransferase; TGP/ALT: alanine aminotransferase; AIN93: standard diet; AIN93G + F15: standard diet with 15% *Apis mellifera* meal; AIN93G + F30: standard with 30% *Apis mellifera* meal; HFD diet: hypercaloric diet; HFD + F15: hypercaloric diet with 15% *Apis mellifera* meal; HFD + F30: hypercaloric diet with 30% *Apis mellifera* meal.

3.3 Macroscopic and histological analysis

Seeking to better understand the effects of *Apis mellifera* meal, histological analyses were performed, as presented in (Fig. 3). Among the standard diet groups, there was no

significant difference in fat deposition in hepatocytes AIN93G ($0.00 \pm 0.00 \mu\text{m}^2$); AIN93G + F15 ($3327 \pm 1024 \mu\text{m}^2$); AIN93G+F30 ($13950 \pm 3360 \mu\text{m}^2$) (Fig. 3 A). In turn, the groups fed hypercaloric diet had a significant increase in fat deposition among hepatocytes (Fig. 3 B). However, the introduction of bee meal significantly decreased fat deposition in HFD+F15 ($15680 \pm 7401 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.01$); HFD + F30 ($9238 \pm 7479 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.01$) groups compared to their control HFD ($103900 \pm 34260 \mu\text{m}^2$) (Fig.3 B).

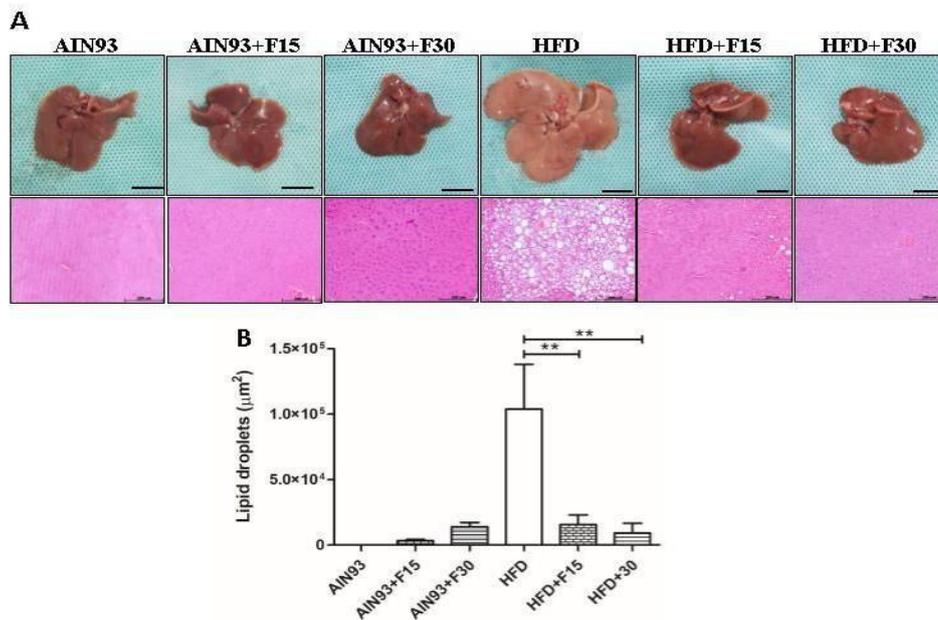


Figure 3. Histological evaluation of liver on H&E staining of mice fed standard and hyperlipidic diets. A) Macroscopic and histological images of liver tissue; B) Area of fat droplets in liver tissue (μm^2). ****** $p < 0.01$, ANOVA; AIN93: standard diet; AIN93 + F15: standard diet with 15% *Apis mellifera* meal; AIN93 + F30: standard with 30% *Apis mellifera* meal; HFD diet: hypercaloric diet; HFD + F15: hypercaloric diet with 15% *Apis mellifera* meal; HFD + F30: hypercaloric diet with 30% *Apis mellifera* meal.

3.4 Expressão Gênica de PPAR γ , SRBP1, GPX4 mRNA

The *Apis mellifera* bee meal consumption treatment generated gene expression, as shown in (Fig. 4). The PPAR γ gene expression decreased significantly in the AIN93 group (0.67 ± 0.06 A.U.) ($p < 0.05$) and AIN 93G + 30 group (2.43 ± 0.31 A.U.) ($p < 0.001$) compared to AIN 93+15 group (4.33 ± 2.25 A.U.). In the groups fed with hyperlipidic diet there was a significant reduction in PPAR γ expression in HFD + 15 (1.09 ± 0.25 A.U.) ($p < 0.05$) and HFD + 30 (0.81 ± 0.0 A.U.) ($p < 0.01$) compared to HFD group ($2.16 \pm$

0.40 A.U.) (Fig.4 A). SREBP1c gene expression showed lower significance in the control AIN93G (2.72 ± 0.74 A.U.) ($p < 0.01$) and the AIN93G + 30 group (0.41 ± 0.12 A.U.) ($p < 0.01$) compared to the AIN93G + 15 group (3.60 ± 1.59 A.U.) In the groups of mice fed hyperlipidic diet, significantly higher SREBP1c expression was observed in the HFD group (3.63 ± 1.01 A.U.) compared to the HFD + 15 (3.63 ± 1.01 A.U.) ($p < 0.05$) and the HFD+30 group (0.77 ± 0.15 A.U.) ($p < 0.01$) (Fig. 4 B).

The GPX4 gene showed a trend of lower expression in the AIN93G + 15 (0.58 ± 0.13 A.U.) and AIN93 + 30 (0.74 ± 0.15 A.U.) treated groups compared to the AIN93G group. However, the HFD + 15 (0.74 ± 0.15 A.U.) and HFD (0.74 ± 0.15 A.U.) groups showed a lower expression trend, compared to the HFD + 30 (0.38 ± 0.07 A.U.) group as shown in (Fig. 4 C).

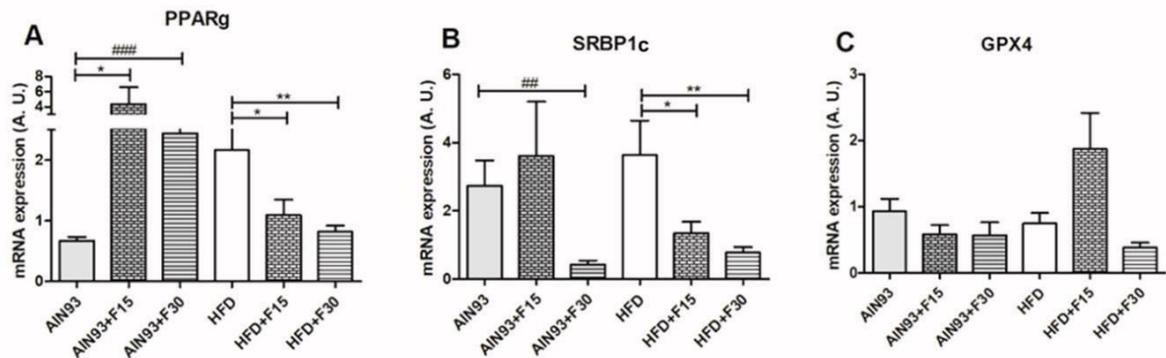


Figure 4. Liver gene mRNA expression in mice fed standard and hyperlipidic diets. (A) mRNA expression of PPARg. (B) mRNA expression of SRBP1. (C) mRNA expression of GPX4. Values are expressed by significance related between groups group. $p < 0.05$, $p < 0.01$, ANOVA; ### $p < 0.0001$ T-test. ST. AIN93: standard diet; AIN93G + F15 standard diet with 15% *Apis mellifera* meal, AIN93G + F30, standard with 30% *Apis mellifera* meal, HFD: hypercaloric diet; HFD+F15: hypercaloric diet with 15% *Apis mellifera* meal, HFD + F30: hypercaloric diet with 30% *Apis mellifera* meal.

Discussion

The main findings of this study showed the effects of *Apis mellifera* bee whole meal flour evaluated for the first time using the obesity model with the induction of hyperlipidic diet. The main result showed an expressive reduction in hepatic steatosis of the animals that received the diet with *Apis mellifera* whole bee flour, corroborating other findings that evaluated the consumption of insect flour (KAGEYAMA *et al.*, 2018; CHAO *et al.*, 2014;

JANG *et al.*, 2008).

On the other hand (CHAO *et al.*, 2014), other studies have shown that diet, with insects as a source, evaluating human health benefits and its metabolic potential, are still limited. Previous studies showed a reduction in dyslipidemia with the use of insect meal (SOUSA *et al.*, 2020).

Obesity induces a number of metabolic changes such as: disorders associated with cardiovascular disease, kidney disease and type II diabetes mellitus, and hepatic steatosis. In their results they found a decrease in body weight after treatment with *Apis mellifera* bee meal in figure 1A, as well as a reduction in liver size and a decrease in hepatic steatosis (Fig. 1B) (GESSNER *et al.*, 2019).

Hepatic steatosis triggers a variety of changes that produces an inflammatory condition causing liver damage, characterized by the dosage of liver enzymes GOT and GPT (Fig. 2) (FARRELL *et al.*, 2006). In the present study, GOT levels were increased in AIN93 control and HFD groups compared to the treatment groups (Fig. 2A). However, GPT levels showed increased in the control group and HFD (Fig. 2B). GOT/GPT ratio, showed reduced in the groups that were treated with *Apis mellifera* bee whole meal flour (Fig. 2C).

The diets of the AIN93 and HFD groups were calculated to be isoenergetic, since all also have the same macronutrient value, namely protein, carbohydrates, and lipids. Casein was replaced with *Apis mellifera* insect meal as the protein source. Therefore, the quality of the protein measured by the types of amino acids present in the diets may partially justify the better metabolic and body results (FONTES *et al.*, 2019).

The development of hepatic steatosis was evidenced in the groups of mice that were offered the high fat diet, a parameter also evaluated in other studies. The higher fat deposition in the adipocytes of the HFD groups indicated that long-term feeding causes hypercholesterolemia. (Fig. 3B) (CHOW *et al.*, 2014).

In addition, we evaluated the expression of lipogenic genes in liver tissue. PPAR γ is an important regulator of lipid and glucose metabolism in various cell types, thus becoming nuclear receptors used as targets for drug development for the treatment of metabolic diseases, including hepatic steatosis. The AIN93G + 30, HFD + 15 and HFD + 30 groups show lower expression making it evident that in these groups there was an improvement in the lipid profile (Fig. 4A) (LISS; FINCK, 2017).

Similarly, there was an increase in SREBP1c mRNA levels in the AIN93G + 15 and HDF

groups, considering that SREBP1 is an important marker related to fat synthesis and that these diets have a higher rate of fat (Fig. 4B). SREBP1c is a transcription factor activated in lipogenic tissues. Studies have shown that increased hepatic steatosis may be related to increased expression of the sterol regulatory element binding protein (MASSART *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2021).

GPX4 plays a key role in protecting cells against free radical damage and is an antioxidant in cellular protection against damage caused by oxidative stress. GPX4 levels were increased in the AIN93G and HFD control groups, promoting greater cell protection and lower expression in the groups containing *Apis mellifera* meal, indicating an improvement in inflammation caused by hepatic steatosis (Fig. 4C) (ZEMOLIN *et al.*, 2012).

Conclusion

In conclusion, the present results showed that dietary supplementation with *Apis mellifera* whole bee flour can provide health benefits by reducing hepatic steatosis, with metabolic regulation and modulating genes involved in lipid metabolism. Thus, the whole *Apis mellifera* bee flour becomes a functional food with potential use in the reduction of fat in the liver, thus being a prevention treatment in hepatic steatosis.

Acknowledgments

This work was supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Author Contributions

ALN article writing and data analysis, VHDG and BVC data review, JHSP, AMBP, ALSG, UAP and SHSS critical of important intellectual content. The authors are responsible for the evaluation of this article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

ANDRADE, J. M. *et al.* Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 915-919, 2014.

AYLANC, V. *et al.* From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. **Trends in Food Science Technology**, v. 109, p. 464-481, 2021.

BICALHO, A. H. *et al.* Liver Damage Produced by Malnutrition is Improved by Dietary Supplementation in Mice: Assessment of a Supplement Based on Buriti (A Cerrado Fruit) and Dairy By-products. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 1, n. 29, p. 29-35, 2021.

BRASILIAN COMPENDIUM OF ANIMAL FEEDING, São Paulo: **Sindirações**, 2009. (13) Eurachem/Citac. Guide CG 4 ...URL: www.cientec.rs.gov.br

CAI, Z. *et al.* Differential metabolic and hepatic transcriptome responses of two miniature pig breeds to high dietary cholesterol. **Life Sci**, v. 250, p. 117514, 2020.

CHAO, J. *et al.* Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e96969, 2014.

CHOW, J. D. *et al.* Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, 419-431, 2014.

FARRELL, G. C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S99-S112, 2006.

FONTES, T. V. *et al.* Digestibility of Insect Meals for Nile Tilapia Fingerlings. **Animals (Basel)**, v. 9, n.4, p.181, 2019.

FREITAS, D. F. *et al.* *Acosmium dasycarpum* (Vog.) Yakovlev root bark reduces obesity induced by hypercaloric diet in mice. **Phytochemistry Letters**, v. 44, p. 23-30, 2021.

GESSNER, D. K. *et al.* Insect Meal as Alternative Protein Source Exerts Pronounced Lipid-Lowering Effects in Hyperlipidemic Obese Zucker Rats. **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 4, p. 566-577, 2019.

GUIMARÃES, V. H. D. *et al.* Comparative study of dietary fat: lard and sugar as a better obesity and metabolic syndrome mice model. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 11, p. 1-11, 2020.

JANG, A. *et al.* Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. **Chemical Biological Interactions**, v. 174, n. 2, p. 109-17, 2008.

KAGEYAMA, M. *et al.* Anti-tumor and anti-metastasis activities of honey bee larvae powder by suppressing the expression of EZH2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 690-696, 2018.

LANGE, K. W.; NAKAMURA, Y. Edible insects as future food: chances and challenges. **Future Food: Journal on Food Agriculture and Society**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 2021.

LI, K. *et al.* Evaluation of the Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activities of Honey Bee Larva Powder. **Journal Medicinal Food**, v. 23, n. 7, p. 772-782, 2020.

LI, K. K. *et al.* Cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) water extract inhibits adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 preadipocytes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20172, 2016.

LISS, K. H.; FINC, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimie**, v. 136, p. 65-67, 2017.

MASSART, J. *et al.* Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, 1361-1374, 2012.

MEKURIA, S. A. *et al.* Growth performance, biochemical and haematological parameters of

BALB/c mice fed on staple grains and bee larvae (*Apis Mellifera*) blended complementary foods. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e09003, 2022.

MENDES, K. L. *et al.* Acute oral treatment with resveratrol and Lactococcus Lactis Subsp. Lactis decrease body weight and improve liver proinflammatory markers in C57BL/6 mice. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 2, p. 1725-1734, 2021.

MORAES, D. S. *et al.* Enalapril improves obesity associated liver injury ameliorating systemic metabolic markers by modulating Angiotensin Converting Enzymes ACE/ACE2 expression in high-fat feed mice. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 152, p. 106501, 2021.

OLIVEIRA, J. R. *et al.* Dietary supplementation with Madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) flour improves metabolic parameters reducing hepatic inflammatory markers in obese mice. **Recent Patents on Computer Science**, v. 12, n. 2, p. 112-122, 2022.

OLIVEIRA, J. R. *et al.* Diet Supplementation with Madagascar Cockroach Flour (*Gromphadorhina portentosa*) Improved Malnourished Mice Metabolism and Ameliorated Liver Inflammatory Markers. **Recent Patents: Food Nutrition & Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 112-122, 2021.

RICE, M. C.; O'BRIEN, S. J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature**, v. 283, n. 5743, p. 157-161, 1980.

SONG, Y-P. *et al.* DNA hydroxymethylation reprogramming of β -oxidation genes mediates early-life arsenic-evoked hepatic lipid accumulation in adult mice. **Journal of Hazardous Materials**, v. 131, p. 128511, 2022.

SOUSA, J. N. *et al.* Oral gallic acid improve liver steatosis and metabolism modulating hepatic lipogenic markers in obese mice. **Experimental Gerontology**, v. 134, p. 110881, 2020.

SOUSA, J. N. *et al.* Oral Treatment with Davilla Elliptica A. St.-Hil. Leaves Improves Liver Steatosis and Lipid Metabolism on a Diet-Induced Obese Mice Model. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100130, 2021.

YANG, Z. *et al.* The transcription factors CREBH, PPAR α , and FOXO1 as critical hepatic mediators of diet-induced metabolic dysregulation. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 95, p. 108633, 2021.

YIN, Y. N *et al.* Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 27, p. 3394-401, 2010.

ZEMOLIN, A. P. *et al.* Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. **Toxicology**, v. 302, n. 1, p. 60-67, 2012.

ZENG, Q. *et al.* Prophylactic and therapeutic effects of different doses of vitamin C on high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110792, 2020.

ZHAO, M. *et al.* Current innovations in nutraceuticals and functional foods for intervention of non-alcoholic fatty liver disease. **Pharmacological Research**, v. 166, p. 105517, 2021.

5. CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostraram que a farinha integral de abelha *Apis mellifera* diminui a esteatose hepática, com expressão dos genes SREBP1c e PPARg nos grupos tratados, com dieta hiperlipídica. Sendo o gene GPX4 considerado responsável pela proteção celular, teve maior aumento e atividade em relação às análises bioinformáticas. Além disso, a administração da farinha integral de *Apis mellifera* foi capaz de induzir alterações metabólicas em camundongos obesos, reduzindo o ganho de peso e melhorando os parâmetros histológicos. Esses resultados apontam para um potencial uso da farinha integral de *Apis mellifera* na prevenção ou tratamento da obesidade, reduzindo a gordura no fígado, sendo, portanto, um potencial alimento funcional, para tratamento da esteatose hepática.

REFERÊNCIAS

ABALLAY, L. R. *et al.* Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 3, p. 168-179, 2013.

AGUILERA-MÉNDEZ, A. Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente [Nonalcoholic hepatic steatosis: a silent disease]. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 56, n. 6, p. 544-549, 2019.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Group IDFETFC. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. **Lancet**. v. 366, n. 9491, p. 1059-62, 2005.

ALBERTI, K. G, *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and blood Institute; American Heart association; world Heart federation; International atherosclerosis society; and International association for the study of obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.

BARIK, A. *et al.* Metabolic syndrome among rural Indian adults. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 23, p. 129-135, 2018.

BARRERA, F; GEORGE, J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. **Clinical Liver Disease**, v. 18, p. 91-112, 2014.

BERGHEIM, I. *et al.* Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. **Journal of Hepatology**, v. 48, p. 983-992, 2008.

DE CARVALHO VIDIGAL, F. *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1198, 2013.

- CHAN, J. C.; TONG, P.C.; CRITCHLEY, J. A. The insulin resistance syndrome: mechanisms of clustering of cardiovascular risk. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 45-57, 2002.
- CHEUNG, K.; LEE, S. S.; RAMAN, M. Prevalence and mechanisms of malnutrition inpatients with advanced liver disease, and nutrition management strategies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 117-125, 2012.
- CHIU, S. *et al.* Effect of fructose on markers of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 416-423, 2014.
- CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A.; BELLENTANI, S. Nutraceutical Approach to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): The Available Clinical Evidence. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1153, 2018.
- CROITORU, A. *et al.* Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, *Juglans regia*. **Current Pharmaceutical**, v. 25, n. 2, p. 119-131.
- CUSCHIERI, S. *et al.* The effect of age, gender, TG/ HDL-C ratio and behavioral lifestyles on the metabolic syndrome in the high-risk Mediterranean Island population of Malta. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, p. S321-S327, 2017.
- DEVARAJ, S.; ROSENSON, R. S.; JIALAL, I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 431-453, 2004.
- DONGIOVANNI, P. *et al.* Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 29, p. 1-11, 2016.
- ELHASSAN, M. *et al.* Quality Aspects of Insects as Food-Nutritional, Sensory, and Related Concepts. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 95, 2019.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1746-1755, 2014.

FLOREZ, H. *et al.* Prevalence and risk factors associated with the metabolic syndrome and dyslipidemia in white, black, Amerindian and mixed hispanics in Zulia state, Venezuela. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 63-77, 2005.

FOUKS, B. *et al.* The genomic basis of evolutionary differentiation among honey bees. **Genome Research**, v. 31, n. 7, p. 1203-1215, 2021.

GEORGE, A. *et al.* Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 50, p. 68-76, 2009.

GHOSH, S.; JUNG, C.; MEYER-ROCHOW, V. B. Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, *Apis mellifera* ligustica as a sustainable food source. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 2, p. 487-495, 2016.

GHOSH, S. *et al.* Nutritional Composition of Honey Bee Drones of Two Subspecies Relative to Their Pupal Developmental Stages. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 759, 2021. doi:

GRUNDY, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735-2752, 2005.

HABER, M. *et al.* Edible larvae and pupae of honey bee (*Apis mellifera*): Odor and nutritional characterization as a function of diet. **Food Chemistry**, v. 292, p. 197-203, 2019.

HALLSWORTH, K. *et al.* Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. **Hepatology**, v. 60, p. 1278-1283, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome**. 2006. Brussels, Belgium.

JENSEN, A. B. *et al.* Standard methods for *Apis mellifera* brood as human food. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1-28, 2019.

KAGEYAMA, M. *et al.* Anti-tumor and anti-metastasis activities of honey bee larvae powder

by suppressing the expression of EZH2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 690-696, 2018.

KAUR, R.; KAUR, M.; SINGH, J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 121, 2018.

KOUŘIMSKÁ, L.; ADÁMKOVÁ, A. Nutritional and sensory quality of edible insects. **NFS Journal**, v. 4, p. 22-26, 2016.

KRIS-ETHERTON, P. M. *et al.* Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion, and absorption. **Lipids**, v. 40, p. 1193-1200, 2005.

LAI, J. C. *et al.* Malnutrition, frailty, and sarcopenia in patients with cirrhosis: 2021 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 74, p. 1611-1144, 2021.

LANGELLA, C. *et al.* Study of the effects of a diet supplemented with active components on lipid and glycemic profiles. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 180-186, 2015.

LI, K. *et al.* Evaluation of the Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activities of Honey Bee Larva Powder. **Journal of Medicinal Food**, v. 23, n. 7, p. 772-782, 2020.

LI, S. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2015. doi:

MA, J. *et al.* Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 2, p. 462-469, 2015. doi:

MA, L. *et al.* Molecular Mechanism and Health Role of Functional Ingredients in Blueberry for Chronic Disease in Human Beings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2785, 2018.

MEKURIA, S. A. *et al.* Nutritional Quality and Safety of Complementary Foods Developed

from Blends of Staple Grains and Honey Bee Larvae (*Apis mellifera*). **International Journal of Food Science**, v. 2021, p. 5581585, 2021.

MOZHUI, L. *et al.* Traditional Knowledge of the Utilization of Edible Insects in Nagaland, North-East India. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 852, 2020.

MUJICA, V. *et al.* Evaluation of metabolic syndrome in adults of Talca city, Chile. **Nutrition Journal**, v. 7, p. 14, 2008.

MUSSO, G. *et al.* Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 909-916, 2003.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). **Expert Panel on detection E, treatment of high blood cholesterol in A**. Executive summary of the third report of the National cholesterol education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment Panel III). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, 2001.

NI, Y. *et al.* Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17192, 2015.

O'KENNEDY, N.; RAEDERSTORFF, D.; DUTTAROY, A. K. Fruitflow®: the first European Food Safety Authority-approved natural cardio-protective functional ingredient. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 461-482, 2017.

PERSEGHIN, G. *et al.* Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 683-688, 2007.

PHILLIPS, C. M. Metabolically healthy obesity: personalised and public health implications. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 189-191, 2016.

PI-SUNYER, F. X. Pathophysiology and long-term management of the metabolic syndrome. **Obesity Research**, v. 12, p. 174S-180S, 2004.

PROMRAT, K. *et al.* Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 51, p. 121-129, 2010.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **JAMA**, v. 313, n. 22, p. 2263-2273, 2015.

RIOUX, V.; LEGRAND, P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, p. 752-758, 2007.

RUSSO, I. The prothrombotic tendency in metabolic syndrome: focus on the potential mechanisms involved in impaired haemostasis and fibrinolytic balance. **Scientifica (Cairo)**, v. 2012, p. 525374, 2012.

SALOMONE, F.; GODOS, J.; ZELBER-SAGI, S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. **Liver International**, v. 36, n. 1, p. 5-20, 2016.

SAMSON, S. L.; GARBER, A. J. Metabolic syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 1-23, 2014.

SULLIVAN, S. *et al.* Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 55, p. 1738-1745, 2012.

TANG, Q. *et al.* Queen bee larva consumption improves sleep disorder and regulates gut microbiota in mice with PCPA-induced insomnia. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101256, 2021.

TOSHIMITSU, K. *et al.* Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. **Nutrition**, v. 23, p. 46-52, 2007.

VANQA, N.; MSHAYISA, V. V.; BASITERE, M. Proximate, Physicochemical, Techno-Functional and Antioxidant Properties of Three Edible Insect (*Gonimbrasia belina*, *Hermetia illucens* and *Macrotermes subhylanus*) Flours. **Foods**, v. 11, n. 7, p. 976, 2022. doi:

VOS, M. B.; LAVINE, J. E. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 57, p. 2525-2531, 2013.

VU, J. D. *et al.* Impact of C-reactive protein on the likelihood of peripheral arterial disease in United States adults with the metabolic syndrome, diabetes mellitus, and preexisting cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 96, n. 5, p. 655-658, 2005.

YOUNIS, A. *et al.* Metabolic syndrome is independently associated with increased 20-year mortality in patients with stable coronary artery disease. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 149, 2016.

YOUNOSSI, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZHANG, H. *et al.* Protective effects of polydatin against sulfur mustard-induced hepatic injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 367, p. 1-11, 2019. doi:

ANEXOS

ANEXO - Parecer fazer comissão de Ética e Pesquisa



Universidade Estadual de Montes Claros
Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar
Animal da Unimontes
CEEBEA



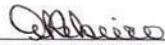
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 224, relativo ao projeto intitulado “EFEITOS DA INGESTÃO DA FARINHA DE INSETOS SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E SOMÁTICOS EM ANIMAIS E HUMANOS” Coordenador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da UNIMONTES, e encontra-se APROVADO.

A quantidade total de animais aprovados pelo CEEBEA para este projeto foi de 272 animais.

Este certificado é válido por cinco anos após sua aprovação.

Montes Claros, 30 de Abril de 2021.


Profª Drª Antonia de Maria Filha Ribeiro
Coordenadora do CEEBEA/UNIMONTES
Coordenadora da
CEEBEA da Unimontes

Ao retornarmos as atividades presenciais todos os documentos como CD, protocolo, projeto impresso, memorando ou Ata do departamento deverão ser entregues a CEEBEA/Pró-Reitoria de Pesquisa.