

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Bruno Gallotti Costa

**EFEITO PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE MATERNO
HUMANO COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA EM MODELO DE OBESIDADE
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2024

Bruno Gallotti Costa

**EFEITO PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE MATERNO
HUMANO COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA EM MODELO DE OBESIDADE
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Coorientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Belo Horizonte/MG

2024

043

Costa, Bruno Gallotti.

Efeito probiótico de bactérias isoladas do leite materno humano como estratégia terapêutica em modelo de obesidade experimental [manuscrito] / Bruno Gallotti Costa. – 2024.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Coorientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Obesidade. 3. Probióticos. 4. Microbiota.
5. Leite Humano. 6. Lactobacillus gasseri. 7. Lactobacillus rhamnosus.
I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Leite, Jacqueline Isaura Alvarez. III.
Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **BRUNO GALLOTTI COSTA**

Nº REGISTRO: **2020705421**

Às 13:30 horas do dia **15 de março de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Adriano Gomes da Cruz (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ)), Andreza Fabro de Bem (Universidade de Brasília (UnB)), Marina Chaves de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)), Angelica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)), Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador) e Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Efeito probiótico de bactérias isoladas do leite materno humano como estratégia terapêutica em modelo de obesidade experimental**" do aluno **Bruno Gallotti Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 15 de março de 2024

Membros da Banca:

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem

Profa. Dra. Marina Chaves de Oliveira

Profa. Dra. Angelica Thomaz Vieira

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

(Coorientadora)

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Andreza Fabro de Bem, Usuária Externa**, em 18/03/2024, às 06:51, 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 **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 18/03/2024, às 07:25, 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 **Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 18/03/2024, às 07:30, 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 **Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Professora do Magistério Superior**, em 18/03/2024, às 12:36, 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 **Caio Tavares Fagundes, Coordenador(a)**, em 18/03/2024, às 12:53, 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 **Adaliene Versiani Matos Ferreira, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 22/03/2024, às 12:48, 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 **Adriano Gomes da Cruz, Usuário Externo**, em 01/07/2024, às 09:27, 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 3100904 e o código CRC 367DCA83.

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

- *Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins*

Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN), Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG

- *Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite*

Laboratório de Microbiota e Imunomodulação (LMI), Departamento de Imunologia, ICB, UFMG

- *Profa. Dra. Angélica Thomaz Vieira*

Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia, ICB, UFMG

- *Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali*

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM), Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

- *Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli*

Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia (FaFar), UFMG

- *Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso*

- *Profa. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes*

Laboratório de Genética Molecular e Celular (LGMC), Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG

- *Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo*

RESUMO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura que apresenta riscos à saúde. A microbiota intestinal tem função importante na obesidade e, assim, os probióticos surgem como uma possibilidade de tratamento, pois são capazes de modular a microbiota do hospedeiro e conferir benefícios à sua saúde. Assim, esse trabalho visa avaliar o efeito de bactérias isoladas do leite materno humano como estratégia terapêutica em modelo de obesidade em camundongo. Inicialmente, foi realizado um *screening* utilizando camundongos C57BL/6 machos de oito semanas de idade que foram divididos em grupos tratados com cada uma das nove bactérias isoladas do leite materno (10^9 UFC/mL) e a dieta indutora de obesidade (DIO) durante oito semanas. As bactérias que apresentaram os melhores resultados em modelo de obesidade foram *Lactobacillus gasseri* (7) e *Lacticaseibacillus rhamnosus* (64). Em seguida, foi avaliado o efeito da administração de *L. gasseri*, *L. rhamnosus* e uma mistura das duas bactérias em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Camundongos C57BL/6 machos de oito semanas de idade foram divididos em grupos tratados com a dieta controle (AIN-93M) ou DIO e receberam 0,1 mL do potencial probiótico diariamente (10^9 UFC/mL) durante oito semanas. Os grupos tratados com as bactérias de forma isolada apresentaram redução do peso corporal, maior tolerância a glicose, diminuição de enterobactérias nas fezes e aumento de bactérias do ácido lático, diminuição do colesterol total e colesterol HDL e melhora na cognição. Já o grupo tratado com a mistura das duas bactérias não apresentou efeito protetor em modelo de obesidade. Em seguida, avaliamos se o efeito protetor das bactérias poderia ser transmitido verticalmente para a prole. Mães grávidas foram tratadas com as bactérias durante a gestação e todo o período de amamentação e, após o desmame, os camundongos machos foram selecionados para indução da obesidade. Observamos que houve uma prevenção do ganho de peso na prole das mães que receberam os probióticos durante a gestação e amamentação. Observamos também nesses animais uma melhora no perfil lipídico e glicêmico e diminuição da inflamação no fígado. Dessa forma, *L. gasseri* e *L. rhamnosus* apresentaram efeito benéfico na redução da obesidade, quando administradas separadamente, sendo uma possível estratégia terapêutica para esse modelo.

Palavras-chave: obesidade; probióticos; microbiota; leite materno; *Lactobacillus gasseri*; *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

ABSTRACT

Obesity is characterized by the excessive or abnormal accumulation of fat, posing health risks. Intestinal microbiota plays an important role in obesity, and thus, probiotics emerge as a treatment possibility, as they can modulate the host's microbiota and confer health benefits. Therefore, this study aims to evaluate the effect of bacteria isolated from breast milk as a therapeutic strategy in a mouse model of obesity. Initially, a screening was performed using eight-week-old male C57BL/6 mice, which were divided into groups treated with each of the nine bacteria isolated from breast milk (10^9 CFU/mL) and the obesity-inducing diet (DIO) for eight weeks. The bacteria that showed the best results in the obesity model were *Lactobacillus gasseri* (7) and *Lacticaseibacillus rhamnosus* (64). Next, the effect of administering *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, and a mixture of the two bacteria was evaluated in a murine model of diet-induced obesity. Eight-week-old male C57BL/6 mice were divided into groups treated with the control diet (AIN-93M) or DIO and received 0,1mL of the probiotic (10^9 CFU/mL), daily, for eight weeks. The groups treated with the bacteria individually showed reduced body weight, improved glucose tolerance, decreased enterobacteria, increased lactic acid bacteria, decreased total cholesterol and HDL cholesterol, and improved cognition. However, the group treated with the mixture of the two bacteria did not show a protective effect in the obesity model. Next, we assessed whether the protective effect of the bacteria could be vertically transmitted to the offspring. Pregnant mothers were treated with the bacteria during gestation and the entire breastfeeding period, and after weaning, male mice were selected for obesity induction. We observed prevention of weight gain in the offspring of mothers who received probiotics during gestation and breastfeeding. We also observed in these animals an improvement in lipid and glycemic profiles and a decrease in liver inflammation. Thus, *L. gasseri* and *L. rhamnosus* showed a beneficial effect in the reduction of obesity when administered separately, representing a possible therapeutic strategy for this model.

Key-words: obesity; probiotics; microbiota; human milk, *Lactobacillus gasseri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de controle do apetite associado ao crescimento bacteriano da microbiota intestinal.....	17
Figura 2 – Microscopia eletrônica de <i>Bifidobacterium</i> sp. (esquerda) e <i>Lactocaseibacillus casei</i> Shirota (direita).....	21
Figura 3 – Representação do ganho ponderal.	40
Figura 4 – Análise do ganho ponderal, índice de Lee e IMC dos animais.....	42
Figura 5 – Teste de antagonismo entre <i>L. gasseri</i> e <i>L. rhamnosus</i>	43
Figura 6 – Avaliação dos níveis séricos de colesterol total.....	43
Figura 7 – Avaliação da área sob a curva para os testes de sensibilidade à insulina (TSI).	48
Figura 8 – Avaliação da concentração de enterobactérias.....	50
Figura 9 – Corte histológico do íleo (1) e jejuno (2)	51
Figura 10 – Avaliação da permeabilidade intestinal por meio da medição da radioatividade no sangue após administração oral de DTPA marcado com tecnécio..	51
Figura 11 – Corte histológico do fígado.....	54
Figura 12 – Avaliação dos parâmetros inflamatórios no fígado através da medição da atividade de (A) MPO, (B) EPO.	55
Figura 13 – Corte histológico do tecido adiposo epididimal.....	57
Figura 14 – Quantificação da produção de IL-10.....	58
Figura 15 – Avaliação da memória de curta duração em animais alimentado com a DIO e tratados com <i>L. gasseri</i> ou <i>L. rhamnosus</i>	61
Figura 16 – Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole.	62
Figura 17 – Análise do índice de massa corporal (IMC).....	63
Figura 18 – Avaliação da área sob a curva para os testes de sensibilidade à insulina (TSI).	64
Figura 19 – Avaliação dos níveis séricos de colesterol total.	65
Figura 20 – Avaliação do influxo de neutrófilos e eosinófilos para o fígado através da medição da atividade de MPO (A) e EPO (B) , respectivamente.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas AIN-93M e DIO.	288
Tabela 2 – Distribuição energética e densidade calórica das dietas AIN-93M e DIO.	289
Tabela 3 – Meios e condições de cultura para a análise qualitativa e quantitativa do conteúdo intestinal dos animais.	366

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AIN-93M	Dieta de Manutenção do Instituto Americano de Nutrição
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área Sob a Curva
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CD14	Cluster of Differentiation 14
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DIO	Dieta Indutora de Obesidade
EPO	Peroxidase Eosinofílica
FaFar	Faculdade de Farmácia
FDA	Food and Drug Administration
GF	<i>Germ-Free</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina e Eosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
kcal	Quilocaloria
LABio	Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
LABIN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LEFM	Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos
LMI	Laboratório de Microbiota e Imunomodulação
LPS	Lipopolissacarídeo
MRS	<i>de Man, Rogosa & Sharpe</i>
MPO	Mieloperoxidase
NB2	Nível de Biossegurança 2
nm	Nanômetro
<i>ob/ob</i>	Mutação no gene da leptina
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Tampão Fosfato-Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PYY	Peptídeo YY
rpm	Rotações por Minuto
TGI	Trato Gastrointestinal
TLR	Receptores do Tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Obesidade	12
1.2 Obesidade e microbiota intestinal	14
1.3 Leite materno	18
1.4 Probióticos	20
1.4.1 Probióticos e obesidade	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Animais e micro-organismos	27
4.2 Dieta	28
4.3 Desenho experimental 1	28
4.4 Desenho experimental 2	29
4.5 Desenho experimental 3	30
4.6 Teste de antagonismo	31
4.7 Avaliação do perfil glicêmico	31
4.8 Avaliação do perfil lipídico	31
4.10 Avaliação de parâmetros imunológicos	33
4.10.1 Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)	33
4.10.2 Medida da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)	34
4.10.3 Dosagem de imunoglobulina a secretória (sIgA)	34
4.10.4 Dosagem de citocinas por ELISA	35
4.11 Análise microbiológica	35
4.12 Análises histológicas	36
4.13 Avaliação comportamental dos animais submetidos à dieta hiperlipídica: teste de campo aberto e realocação de objetos	36
4.14 Análise estatística	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 <i>Screening</i> das bactérias isoladas do leite materno em modelo de obesidade	39

5.2 A administração de <i>L. gasseri</i> e <i>L. rhamnosus</i> , mas não o mix das duas bactérias, foi capaz de prevenir o ganho ponderal e o aumento do Índice de Lee, mas não o IMC, em modelo de obesidade em camundongos.....	40
5.3 Avaliação dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos	43
5.4 Impacto do tratamento de <i>L. gasseri</i> e <i>L. rhamnosus</i> no perfil glicêmico em modelo murino de obesidade.....	46
5.5 Avaliação do impacto de uma dieta hiperlipídica na concentração de enterobactérias e BAL nas fezes de camundongos tratados com DIO	48
5.6 Avaliação histológica e de parâmetros inflamatórios do impacto da dieta hiperlipídica sobre o intestino	51
5.7 Avaliação histológica e de parâmetros inflamatórios no fígado frente ao consumo da dieta indutora de obesidade.....	53
5.8 Avaliação histológica do tecido adiposo e produção de adipocinas	56
5.8 Avaliação comportamental dos animais alimentados com a dieta indutora de obesidade.....	58
5.9 A amamentação pode ser um agente protetor na prevenção do ganho de peso da prole	61
6 PERSPECTIVAS.....	67
7 CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS	67
8 REFERÊNCIAS.....	69
9 FINANCIAMENTO	82
10 ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA ..	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

No corpo humano há quatro tipos principais de tecidos: epitelial, muscular, nervoso e conjuntivo. O tecido conjuntivo é composto principalmente por componentes fibrosos da matriz extracelular que oferecem suporte estrutural e bioquímico para as células, tecidos e órgãos (McKee *et al.*, 2019). Dentre os variados tipos de tecido conjuntivo, temos o tecido adiposo, cuja função é armazenar energia na forma de lipídeos. Em mamíferos, existem dois tipos principais de tecido adiposo: tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco. Os adipócitos do tecido adiposo marrom são caracterizados por conterem diversas gotículas lipídicas e elevado número de mitocôndrias, e sua principal função é dissipar energia na forma de calor; já os adipócitos do tecido adiposo branco se caracterizam por conterem apenas uma única e grande gota lipídica, cuja principal função é controlar a homeostase energética por meio do armazenamento e liberação de lipídeos de acordo com a necessidade metabólica do organismo (Zwick *et al.*, 2018).

O sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura no tecido adiposo que apresentam riscos à saúde (WHO, 2018). O critério utilizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) para o diagnóstico de sobrepeso e obesidade é por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), onde uma pessoa com IMC maior ou igual a 25 kg/m² e menor que 30 kg/m² é considerada com sobrepeso, e uma pessoa com IMC maior ou igual a 30 kg/m² é considerada obesa. O IMC é calculado por meio da divisão do peso do indivíduo (em quilogramas) pelo quadrado da sua altura (em metros). A avaliação da circunferência também pode ser utilizada para diagnóstico da obesidade, em que mulheres com circunferência da cintura maior que 88 cm e homens com circunferência maior que 108 cm apresentam obesidade visceral/central (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016).

A prevalência global de sobrepeso e obesidade tem aumentado em diferentes populações e afetado diferentes faixas etárias nos últimos anos e, desde 1980, essa prevalência dobrou em mais de 70 países (Marques *et al.*, 2020). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em parceria com o Ministério da Saúde, divulgou, em 2020, os dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) a respeito dos números de sobrepeso e obesidade no país (PNS, 2020). Segundo essa pesquisa, mais da metade dos adultos, 60,3%, apresentam sobrepeso, atingindo 96 milhões de brasileiros. Já a obesidade afeta 25,9% da população adulta, o equivalente a 41,2

milhões de adultos. Em relação às crianças brasileiras menores que 10 anos, estima-se que 6,4 milhões tenham sobrepeso, e 3,1 milhões sejam obesas. E considerando todos os adolescentes brasileiros é estimado que 11 milhões tenha excesso de peso, e 4,1 milhões sejam obesos.

O desenvolvimento da obesidade está diretamente relacionado ao surgimento de diversas doenças crônicas e metabólicas, como doenças cardíacas, câncer, artrite, apneia obstrutiva do sono, hipertensão, hiperlipidemia, e diabetes mellitus tipo 2 associada à resistência à insulina (An *et al.*, 2011). Um dos fatores que influenciam o estabelecimento da obesidade é a inflamação crônica de baixo grau e o aumento da susceptibilidade a infecções devido ao mau funcionamento do sistema imune (Sanz; Santacruz; Gauffin, 2010). Indivíduos com obesidade também apresentam aumento do influxo de macrófagos no tecido adiposo e da produção de adipocinas e citocinas e, em contrapartida, há uma diminuição dos níveis de adipocinas anti-inflamatórias e da sensibilidade à insulina (Sanz; Santacruz; Gauffin, 2010).

De um ponto de vista simplista, o acúmulo de gordura no organismo está associado ao desequilíbrio entre quantidade de energia ingerida (dieta hipercalórica) e gasto energético (estilo de vida sedentário); porém, o acúmulo de gordura no organismo e o desenvolvimento da obesidade são mais complexos e envolvem diversos fatores (González-Muniesa *et al.*, 2017). Dessa forma, a obesidade é considerada uma doença multifatorial, onde a genética e fatores ambientais como o estilo de vida do indivíduo contribuem para seu desenvolvimento (Newell *et al.*, 2007).

Com a globalização e o desenvolvimento econômico, também vieram a melhora na qualidade de vida, rigidez em políticas de vigilância sanitária e redução dos níveis de pobreza em alguns países. Porém, os avanços tecnológicos atrelados à globalização criaram fácil acesso da população a alimentos de baixo custo, caracterizados por possuírem baixo valor nutricional e alto valor energético (Malik; Willett; Hu, 2013). A dieta ocidental recebe esse nome porque é uma dieta comum em países ocidentais e se caracteriza pela alta ingestão de proteína e gordura animal, açúcar, álcool e sal, e pelo baixo consumo de frutas e vegetais, que são alimentos ricos em fibras (Statovci *et al.*, 2017). Dietas ricas em gorduras e pobre em fibras contribuem para o desenvolvimento de obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares; essas doenças não estão frequentes apenas no ocidente, mas também em países do oriente entre as pessoas que adotaram o estilo de vida ocidental, como Japão e África do Sul (Statovci *et al.*, 2017).

O consumo de dietas ricas em gordura e açúcar e pobre em fibras leva à disbiose, alterando a composição da microbiota (quantitativa, qualitativa e funcionalmente) e favorecendo o desenvolvimento da obesidade, indicando que a microbiota desempenha papel importante na doença.

1.2 Obesidade e microbiota intestinal

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o papel da microbiota intestinal como um fator para a patofisiologia da obesidade e as desordens metabólicas associadas a ela (Muscogiuri *et al.*, 2019). A microbiota apresenta importante papel na regulação do armazenamento de energia e na modulação da síntese de gordura e, uma vez em disbiose, a diversidade microbiológica diminui e, conseqüentemente, há uma redução do metabolismo energético (Muscogiuri *et al.*, 2019), acarretando em acúmulo de gordura e desenvolvimento da obesidade e doenças metabólicas.

A obesidade está associada a mudanças de grupos e filos específicos na microbiota; o aumento da população de Bacillota e a redução de Bacteroidota têm sido associados ao desenvolvimento da obesidade em camundongos e humanos (Sanz; Santacruz; Gauffin, 2010). Um estudo conduzido por Ley e colaboradores (2005) visou analisar a composição da microbiota intestinal do ceco de camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*) e magros (*+/ob* e *+/+*). Foi observado que camundongos geneticamente obesos consumiam mais ração que os magros, resultando em maior peso corporal e maior acúmulo de tecido adiposo visceral epididimal. Interessantemente, o desenvolvimento da obesidade estava relacionado a uma mudança na composição da microbiota; a microbiota do ceco dos camundongos obesos teve uma redução significativa de Bacteroidota e aumento da abundância de Bacillota, em comparação aos animais não obesos.

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade de quatro maneiras: aumento da capacidade de extrair energia da dieta, modulação da lipogênese no fígado, regulação do apetite por meio de hormônios da saciedade e ativação da resposta imune inata via interação de lipopolissacarídeo (LPS) com *Toll-like receptors* (TLR) (Koleva; Bridgman; Kozyrskyj, 2015).

O primeiro mecanismo se refere à habilidade da microbiota na extração de energia da dieta. Um estudo de Turnbaugh e colaboradores (2006) visou demonstrar

se a obesidade estaria relacionada ao aumento da capacidade da microbiota de extrair energia da dieta, e se a adiposidade seria uma característica transmissível. Para isso, foi realizado um transplante de microbiota do ceco de camundongos obesos (*ob/ob*) e magros (+/+) para camundongos *germ-free* (GF) por gavagem. Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos de camundongos GF em relação à ingestão de alimento; porém, os camundongos que receberam a microbiota de animais obesos apresentaram um aumento da gordura corporal em comparação aos que receberam a microbiota dos animais magros. O aumento da adiposidade estava diretamente relacionado ao aumento da população de Bacillota. Com isso, foi possível afirmar que a microbiota de indivíduos obesos tende a ser mais eficiente na extração de energia da dieta em relação à microbiota de indivíduos magros, e que o aumento da adiposidade é um traço que pode ser transmissível. Isso pode ser explicado pela capacidade dos microrganismos do filo Bacillota produzir um metabolismo mais completo de uma dada fonte de energia em relação ao filo Bacteroidota e, conseqüentemente, promover de forma mais eficiente a absorção de calorias, acarretando em aumento de peso (Kallus; Brandt, 2012). Outro estudo conduzido por Jumpertz e colaboradores (2011) mostrou que alterações na ingestão calórica estavam diretamente relacionadas à modulação da microbiota dos indivíduos, onde foi observado que o aumento de 20% de Bacillota e a diminuição correspondente de Bacteroidota estavam associados ao aumento da absorção de energia de aproximadamente 150 kcal.

O segundo mecanismo diz respeito à modulação da lipogênese no fígado. A lipogênese é uma via biossintética fundamental que ocorre no fígado que contribui para o armazenamento e secreção de lipídeos (Sanders; Griffin, 2016). Dietas ricas em carboidratos contribuem para o aumento das taxas de lipogênese levando ao acúmulo de lipídeos que podem resultar em problemas de saúde, como obesidade e síndrome metabólica (Jensen-Urstad; Semenkovich, 2012; Sanders; Griffin, 2016). Bactérias da microbiota podem produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) a partir da fermentação de carboidratos, que são transportados para o fígado e servem de substrato para lipogênese. Um estudo conduzido por Goffredo e colaboradores (2016) demonstrou que a microbiota de crianças e adolescentes com obesidade apresentou maior habilidade de fermentar carboidratos em relação àquela de indivíduos magros, aumentando as concentrações de AGCC no organismo. Os AGCC não consumidos

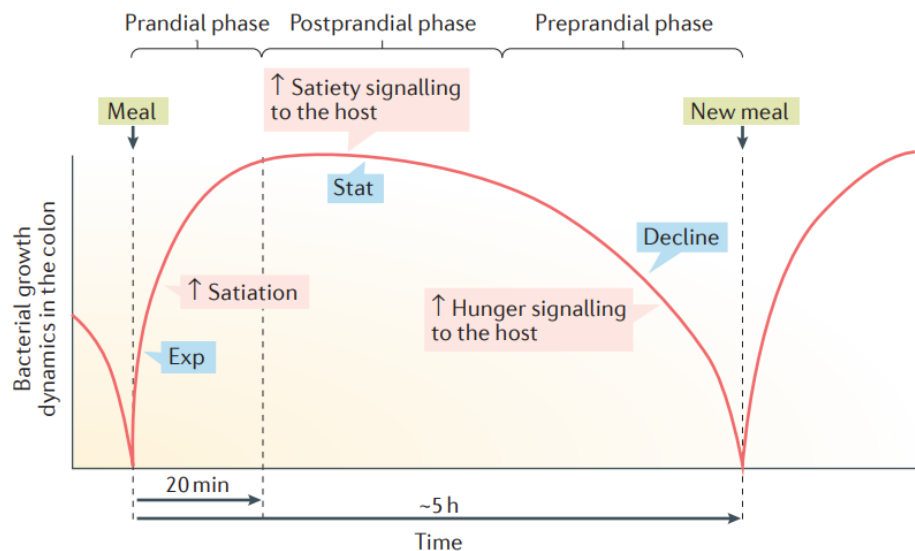
pelos colonócitos são transportados para o fígado onde servem de substrato para gliconeogênese e lipogênese.

O terceiro mecanismo refere-se à regulação do apetite por meio de hormônios da saciedade. Por muito tempo se pensou que o controle do apetite envolvia principalmente a sinalização entre o intestino e cérebro; porém, atualmente, sabe-se que a microbiota intestinal também contribui para a homeostase energética e a ingestão de alimento (Fetissov, 2017). Um modelo proposto por Fetissov (2017) estabelece a relação entre o crescimento da população bacteriana do intestino com os ciclos de alimentação do hospedeiro (figura 1). Nesse modelo, o crescimento bacteriano (fase exponencial) se dá até vinte minutos após a ingestão de alimento. Em seguida, a comunidade bacteriana entra na fase estacionária; durante a fase exponencial (fase prandial) e o início da fase estacionária (fase pós-prandial), as bactérias produzem moléculas que promovem a saciedade. Uma vez que a comunidade bacteriana diminui durante a fase pré-prandial, a sensação de saciedade também diminui, aumentando a sensação de fome. A serotonina é um neurotransmissor envolvido na saciedade cujo precursor é o indol, que é produzido por diversas bactérias, como *Escherichia coli*. O indol também está associado à secreção de glucagon-like peptide (GLP-1), que, por sua vez, possui ação sobre o consumo de alimento (Fetissov, 2017). Outro peptídeo envolvido na saciedade e que é regulado pela microbiota é o PYY, que é um peptídeo produzido pelas células L. As células L são células enteroendócrinas presentes ao longo do eixo longitudinal do intestino e que são sensíveis aos estímulos nutricionais do lúmen intestinal e aos produtos do metabolismo da microbiota, como AGCC e sais biliares secundários (Arora *et al.*, 2018). A microbiota intestinal é capaz de influenciar os níveis de PYY no organismo por meio da regulação da secreção ou do número de células L ou pela expressão do gene que codifica esse peptídeo (Covasa *et al.*, 2019). Camundongos obesos tratados com fibras dietéticas apresentaram mudanças na composição da microbiota com o aumento de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Roseburia* e aumento dos níveis plasmáticos de PYY e GLP-1 (Covasa *et al.*, 2019).

O quarto mecanismo relaciona-se à ativação da resposta imune inata por meio da interação de LPS com *Toll-like receptors*. A obesidade é considerada um quadro inflamatório devido à presença de inflamação crônica de baixo grau devido aos altos níveis sistêmicos de LPS, um componente pró-inflamatório proveniente da parede celular de bactérias Gram-negativo (Bliss; Whiteside, 2018). O LPS cai na circulação

sistêmica devido à ruptura da barreira epitelial ocasionada pela dieta rica em gordura e que leva à disbiose intestinal. A disbiose, por sua vez, diminui a adesão célula-célula do tecido epitelial, aumentando a permeabilidade intestinal. Com o aumento da permeabilidade, há o aumento da translocação de macronutrientes e moléculas do lúmen intestinal, como o LPS, que por sua vez promove a inflamação no hospedeiro, especialmente no tecido adiposo branco (Bliss; Whiteside, 2018). Um estudo conduzido por Cani e colaboradores (2007) demonstrou que uma dieta rica em gordura aumenta os níveis de LPS no plasma de camundongos e que esse aumento estava associado ao aumento do peso e resistência à insulina. Eles observaram também que a infusão de LPS subcutâneo por um mês aumentava o peso corporal dos animais na mesma extensão da dieta rica em gordura. Esse processo era dependente do receptor de LPS, CD14, expresso na membrana de monócitos maduros, macrófagos e neutrófilos; camundongos mutantes para CD14 não apresentaram resistência à insulina após um período de um mês sendo alimentados com dieta rica em gordura.

Figura 1 – Modelo de controle do apetite associado ao crescimento bacteriano da microbiota intestinal.



Fonte: FESTISSOV, 2017.

Assim, fica estabelecido o impacto que o consumo de dietas ricas em gordura e açúcar desempenha sobre a microbiota intestinal e como isso pode impactar sítios extra intestinais, como o tecido adiposo, levando ao desenvolvimento da obesidade. Dessa forma, é razoável dizer que mudanças na composição da microbiota intestinal

e a obesidade podem também afetar outros sítios do corpo, como a composição do leite materno.

1.3 Leite materno

Durante os seis primeiros meses de vida do bebê, o leite materno é uma das principais fontes de alimento do recém-nascido, e, após esse período, a recomendação é que a amamentação perdure até pelo menos os dois anos de vida (Ballard; Morrow, 2013). O leite materno, além de ser uma excelente fonte de nutrientes que contribuirá para o desenvolvimento do bebê, é também constituído por fatores imunológicos que possuem atividade antimicrobiana que contribuirão para a maturação do seu sistema imunológico (Yi; Kim, 2021).

O leite materno é considerado um alimento padrão-ouro, pois contém tudo que o bebê precisa para essa fase do seu desenvolvimento. Ele é constituído por 87% de água, 1% de proteína, 4% de lipídeos e 7% de carboidratos, e destes, 1 a 2,4% são oligossacarídeos; além disso, ele também é composto por vitaminas, minerais e imunoglobulinas (Boquien, 2018). Agora, sabe-se, também, que o leite materno possui um microbioma dinâmico e complexo responsável pela colonização inicial do TGI do recém-nascido e que, conseqüentemente, contribuirá para a formação da sua microbiota (Fernández *et al.*, 2020).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o leite materno era um ambiente estéril, e, com a descoberta da presença de micro-organismos em sua composição, o próximo passo era entender como esse micro-organismos chegaram até lá. Atualmente, duas vias são consideradas como as principais fontes de origem da microbiota do leite materno. A primeira, é o fluxo retrógrado que acontece durante a amamentação em que bactérias da cavidade oral do recém-nascido caem nos ductos mamários da mãe durante a sucção do leite; e a segunda, é por meio da via entero-mamária em que bactérias do TGI materno translocam para a glândula mamária via circulação linfática (Notarbartolo *et al.*, 2022). Como o leite materno antes mesmo da primeira amamentação do bebê já possui micro-organismos e que a microbiota do leite materno é semelhante à microbiota oral do recém-nascido, é reforçada a ideia de que ambas as vias contribuem para a formação da microbiota do leite humano (Moossavi *et al.*, 2019).

Com o auxílio e aprimoramento de técnicas dependente e independente de cultivo, mais de 820 taxa bacterianas já foram identificados no leite materno, sendo a

maioria pertencentes aos filos Bacillota e Pseudomonadota, com prevalência dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Selma-Royo *et al.*, 2021). Além deles, habitantes da cavidade oral, como *Prevotella* e *Veillonella*, da pele, como *Cutibacterium* (antigo *Propionibacterium*) *Corynebacterium* e comensais do intestino, como *Clostridium*, *Blautia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enterococcus* também já foram identificados no leite materno (Mantziari; Rautava, 2021; Selma-Royo *et al.*, 2021). Há também bactérias de gêneros tradicionalmente conhecidos por possuírem potencial probiótico, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e também bactérias do gênero *Leuconostoc* (Damaceno *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020) sendo o leite materno, então, uma fonte alternativa na busca de novos agentes bioterapêuticos.

Diversos fatores podem influenciar a composição e diversidade da microbiota do leite materno, como o estágio de lactação, dieta, tipo de parto, localização geográfica e uso de antibióticos durante a gestação (Kumar *et al.*, 2016). Outro fator importante que impacta a composição microbiológica do leite humano é o índice de massa corporal (IMC) que está diretamente relacionado ao ganho de peso e obesidade. Cabrera-Rubio e colaboradores (2012) demonstraram que o IMC materno e o ganho de peso durante a gestação estão negativamente relacionados à diversidade e à composição taxonômica do microbioma do leite materno, com diferenças significativas quanto à presença de gêneros bacterianos específicos; esses dados reforçam a ideia de que a obesidade é prejudicial em relação à composição da microbiota do leite materno e oferece um mecanismo adicional para explicar o aumento do risco de desenvolvimento da obesidade em crianças com mães com sobrepeso ou obesas. Dois estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (Damaceno *et al.*, 2017, 2021) que visavam a busca de potenciais probióticos no leite materno, também evidenciou essa diferença microbiológica em relação ao IMC, visto que as bactérias com potencial probiótico obtidas nesses trabalhos foram isoladas apenas do leite de mães com o IMC normal.

Assim, em um cenário em que a obesidade é uma doença com alta incidência ao redor do mundo e que a busca por novas terapias é necessária, estratégias terapêuticas focadas na microbiota e no papel que ela desempenha no desenvolvimento da obesidade podem ser uma alternativa para o tratamento da doença. Dessa forma, o uso de probióticos para esse fim vem sendo amplamente estudado.

1.4 Probióticos

O TGI possui uma grande diversidade microbiana que estabelece uma relação simbiótica com o hospedeiro. A composição da microbiota intestinal pode variar devido a diversos fatores, tais como alimentação, idade, fatores ambientais, uso de medicamentos, doenças, dentre outros (Chong; Bloomfield; O'Sullivan, 2018; Hasan; Yang, 2019). Dessa forma, o equilíbrio da microbiota intestinal é de grande importância para o bom funcionamento do organismo e desempenho de diversas funções fisiológicas que garantirão benefícios para a saúde do indivíduo.

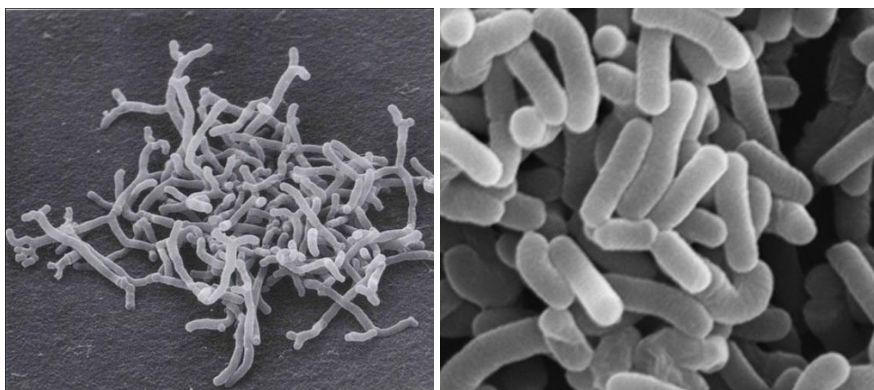
Em 1907, Elie Metchnikoff foi o primeiro a sugerir que bactérias presentes em laticínios, como o iogurte, poderiam exercer alguma influência positiva sobre a microbiota intestinal do hospedeiro (Carvalho *et al.*, 2017; JORJÃO, 2016). Segundo o consenso da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos, o termo probiótico se refere a microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (Hill *et al.*, 2014). Evidências de estudos em animais e humanos têm demonstrado os efeitos benéficos dos probióticos em diversos contextos, como a modulação da microbiota intestinal, redução dos sintomas associados a desordens intestinais, melhora nos níveis de colesterol e perfil lipídico no sangue, remoção de micotoxinas, redução da pressão sanguínea e hipertensão, controle da glicemia e diabetes e aumento da função cognitiva e estado mental (Khalesi *et al.*, 2019).

Os probióticos podem trazer benefícios para o hospedeiro por meio de três mecanismos de ação. O primeiro deles é a capacidade de inibir ou erradicar bactérias patogênicas no intestino; Hemarajata e Versalovic citado por Jorjão (2016, p. 22), demonstraram que um dos mecanismos pelo qual os probióticos podem suprimir micro-organismos patogênicos seria pela indução da produção de β -defensina e IgA pelo hospedeiro. O segundo é a capacidade do probiótico em fortalecer a barreira epitelial da mucosa via produção de muco ou pelo fortalecimento da adesão célula-célula; bactérias probióticas diminuem a permeabilidade intestinal por meio do fortalecimento das zônulas de oclusão do epitélio via indução da expressão de ocludinas, claudinas e ZO-1 e também induzem a produção de muco pela estimulação da expressão gênica de mucina (JORJÃO, 2016). E o terceiro mecanismo se dá por meio da modulação do sistema imune do hospedeiro; os probióticos participam da imunomodulação modulando as funções de células dendríticas, macrófagos e linfócitos T e B via ativação de TLR (Georgieva; Georgiev; Dobromirov, 2015).

A grande maioria das linhagens probióticas estudadas e disponíveis hoje em dia pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*, mas linhagens de outras espécies, como *Lactococcus* sp., *Bacillus* sp. e *E. coli*, também já demonstraram capacidade de conferir benefícios ao hospedeiro (Luo *et al.*, 2019; Mishra; Acharya, 2021). Outros grupos de bactérias comensais também vêm sendo amplamente estudados como potenciais probióticos, como *Akkermansia muciphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum* e *Bacteroides fragilis* ZY-312 (Langella; Guarner; Martín, 2019).

Os gêneros mais comuns de microrganismos probióticos são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, tradicionalmente conhecidos por atribuírem efeitos benéficos à saúde e serem habitantes da microbiota indígena (Figura 2) (Vinderola *et al.*, 2011). Membros do gênero *Bifidobacterium* estão entre os primeiros microrganismos a colonizarem o TGI após o nascimento e podem ser encontrados naturalmente em diversos nichos, como a cavidade oral de humanos, intestino de insetos e esgoto (O’Callaghan; van Sinderen, 2016). São bactérias anaeróbias obrigatórias, não formadoras de esporos e Gram-positivo. Membros do gênero *Lactobacillus* são Gram-positivo, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, sem flagelo, cujo principal produto do metabolismo é o ácido láctico (Slover, 2008). As bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser encontradas em ambientes ricos em nutrientes, como vegetais e frutas em decomposição, e no TGI e urogenital de mamíferos (Carvalho *et al.*, 2017).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de *Bifidobacterium longum* BB536 (esquerda) e *Lacticaseibacillus casei* Shirota (direita).



FONTE: LAU, XIAO e LIONG 2015; LIEW *et al.*, 2018.

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos de diversas linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em modelos de inflamação e infecção *in vitro* e *in*

vivo. Linhagens de *Lactobacillus*, como *L. acidophilus* LA1 são capazes de prevenir a colonização no TGI por bactérias patogênicas, tais como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* por competição e também por eliminar esses patógenos por meio da produção de bacteriocinas e ácido láctico (CARVALHO *et al.*, 2017).

Um estudo conduzido por De Jesus e colaboradores (2019) demonstrou que a administração oral de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA133 diminui a permeabilidade intestinal e a resposta inflamatória em modelo experimental de mucosite induzida por 5-FU (5-fluorouracil).

Veiga e colaboradores (2010) realizaram um experimento para analisar os efeitos do consumo de leite fermentado contendo *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 na redução da inflamação intestinal causada por colite induzida em modelo murino. A manifestação da colite foi acompanhada por disbiose intestinal caracterizada pela expansão de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que foram identificadas como colitogênicas. O consumo do leite fermentado contendo *B. lactis* CNCM I-2494 foi capaz de mudar o microambiente intestinal por meio da redução do pH e aumento da concentração de AGCC. Essa mudança afetou diretamente a composição da microbiota, diminuindo a população de *Enterobacteriaceae* e, conseqüentemente, a inflamação e o dano tecidual da colite.

Além dos efeitos benéficos em modelos de mucosite e colite, em modelos de obesidade o uso de probióticos vem apresentando efeitos promissores. Atualmente, há diversas drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) que vêm sendo utilizadas ao redor do mundo com o propósito de diminuir o peso corporal via inibição do apetite, promoção do metabolismo de gordura e inibição da absorção da gordura consumida. Entretanto, não se sabe qual o efeito que essas drogas podem trazer ao organismo mediante o uso contínuo. Portanto, é necessário considerar novas terapias que sejam mais seguras e que não comprometam o metabolismo geral do organismo (Ji *et al.*, 2019). Outra alternativa atual para o tratamento da doença seria a cirurgia bariátrica; porém, apesar de ser eficaz, é uma intervenção cirúrgica complexa recomendada para casos graves da doença. Com base nisso, a suplementação da dieta, bem como a busca por novos micro-organismos probióticos, podem contribuir para minimizar os casos da doença de forma menos invasiva e sem comprometimento à saúde ao ser consumido a longo prazo.

1.4.1 Probióticos e obesidade

Sabendo que a microbiota do TGI afeta a absorção de nutrientes e a regulação de energia, e que a composição dessa microbiota é diferente entre indivíduos obesos e magros, é possível afirmar que a microbiota desempenha importante função no desenvolvimento da obesidade (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016). Dessa forma, acredita-se que a suplementação da dieta com probióticos pode ser uma estratégia terapêutica para a redução da obesidade devido à capacidade dos probióticos de modularem a microbiota intestinal.

Os efeitos benéficos dos probióticos na redução da obesidade podem ser atribuídos a diversos fatores, como o aumento da população de bactérias produtoras de AGCC, diminuição de bactérias Gram-negativo e consequente diminuição da inflamação crônica de baixo grau induzida por LPS, diminuição do acúmulo de gordura e aumento da sensibilidade à insulina acompanhada do aumento de neuropeptídeos e peptídeos gastrointestinais (Wang *et al.*, 2019).

Wang e colaboradores (2020) analisaram o efeito “anti-obesidade” de *Lacticaseibacillus rhamnosus* LS-8 e *Lactobacillus crustorum* MN047 em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e frutose. A suplementação da dieta com *L. rhamnosus* LS-8 ou *L. crustorum* MN047 diminuiu o peso corporal, mas não alterou o consumo de alimento, indicando que a quantidade de calorias ingeridas não é o único determinante para o desenvolvimento da obesidade. O filo Pseudomonadota consiste em bactérias Gram-negativo e o aumento da população de bactérias desse filo estava diretamente relacionado ao aumento das concentrações de LPS no soro. A administração de *L. rhamnosus* LS-8 e *L. crustorum* MN047 diminuiu as concentrações de bactérias desse filo e, consequentemente, diminuiu os níveis séricos de LPS. O tratamento com os probióticos modulou a microbiota favorecendo o crescimento de bactérias benéficas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lachnospiraceae* NK4A136, todas associadas à produção de AGCC, e a diminuição de *Desulfovibrio* e *Bacteroides* que poderiam induzir a resposta inflamatória no intestino e resistência à insulina por meio da produção de sulfato de hidrogênio e LPS, respectivamente.

Um estudo conduzido por Cano e colaboradores (2013) objetivou analisar o efeito probiótico de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre as alterações metabólicas e imunológicas em camundongos obesos. Foi observado que a suplementação oral com essa bactéria diminuiu o ganho de peso, bem como os

níveis de triglicérides, colesterol e glicose e aumentou a tolerância à glicose e diminuiu a resistência à insulina em camundongos obesos. A administração do probiótico também acarretou mudança na composição da microbiota intestinal; o grupo obeso foi caracterizado pela redução de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e aumento de *Enterobacteriaceae* enquanto a administração de probiótico inverteu esse quadro.

Sato e colaboradores (2020) visaram avaliar o efeito do leite fermentado por *Lactobacillus gasserii* SBT2055 sobre o tamanho do adipócito em ratos. Eles observaram que o probiótico reduziu o tamanho do adipócito e aumentou o número de adipócitos pequenos no tecido adiposo branco e reduziu os níveis de leptina no soro quando comparados com o grupo controle. Esses resultados sugerem que o probiótico desempenha papel na regulação do crescimento do tecido adiposo.

Ji e colaboradores (2019) observaram que a suplementação de *Lactobacillus sakei* CJLS03 melhorou os biomarcadores relacionados à obesidade em modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídeos, em camundongos. A administração de *L. sakei* CJLS03 aumentou as concentrações de AGCC nas fezes e no soro concomitantemente à modulação da microbiota intestinal. O tratamento com o probiótico também reduziu a adiposidade, assim como os níveis de colesterol e triglicérides no soro, sem reduzir o consumo de alimento.

Em casos de sobrepeso e obesidade, uma das práticas mais comuns é a reeducação alimentar e a restrição calórica. Chen e colaboradores (2018) analisaram se o efeito da restrição calórica associada à suplementação com *Lactobacillus mali* APS1 seria mais eficaz no tratamento da obesidade do que a restrição calórica sozinha. Foi observado que o efeito conjunto entre probiótico e a restrição calórica acelerou o processo de perda de peso e o acúmulo de gordura nos animais, assim como foi capaz de modular a microbiota, restaurando sua composição em direção ao estado pré-obeso e diminuindo a população de bactérias associadas à obesidade.

Sendo assim, o consumo excessivo de gordura e açúcar contribuem para a perturbação na composição da microbiota e favorecem o desenvolvimento da obesidade. Estratégias terapêuticas que previnam a disbiose e preservem a homeostase intestinal devem ser consideradas para que o tratamento da doença seja mais eficiente. Dessa forma, a suplementação diária da dieta com probióticos surge como uma aliada na redução dos parâmetros da doença.

2 JUSTIFICATIVA

Obesidade e sobrepeso são definidos pelo acúmulo de gordura no tecido adiposo que pode comprometer a saúde do indivíduo. Desde 1980, o número de indivíduos com obesidade duplicou e, em 2016, 39% das pessoas maiores de 18 anos estavam com sobrepeso e 13% com obesidade. O desenvolvimento da obesidade está associado à pré-disposição para o surgimento de diversas doenças crônicas e metabólicas, como doenças cardíacas, câncer, artrite, apneia obstrutiva do sono, hipertensão, hiperlipidemia, e diabetes mellitus tipo 2. A obesidade é uma doença multifatorial que pode ser ocasionada por fatores ambientais, genéticos e comportamentais. Recentemente, foi estabelecida a associação entre a microbiota e o desenvolvimento da obesidade. A microbiota intestinal está diretamente envolvida em diversos processos fisiológicos no organismo, como a proteção contra infecções, desenvolvimento do sistema imune, manutenção da barreira epitelial, formação de muco e fornecimento de nutrientes para o hospedeiro. A dieta é um dos fatores que mais impactam a composição e a diversidade da microbiota. Com a globalização, houve um aumento do consumo de alimentos pobres em fibras e nutrientes e ricos em gordura e açúcar. Essa dieta, chamada de *Westernized diet*, acarreta disbiose e está associada ao surgimento de diversas doenças, entre elas a obesidade. Atualmente, há diversas drogas aprovadas pela FDA que vêm sendo utilizadas ao redor do mundo com o propósito de diminuir o peso corporal via inibição do apetite, promoção do metabolismo de gordura e inibição da absorção da gordura consumida. Entretanto, não se sabe qual o efeito que essas drogas podem trazer ao organismo mediante o uso contínuo. Portanto, é necessário considerar novas terapias adjuvantes que sejam mais seguras e que não comprometam o metabolismo geral do organismo, como o uso de probióticos. Recentemente, nosso grupo avaliou a microbiota presente no colostro e leite materno de mães com obesidade/sobrepeso e com IMC normal, e observou diferenças na microbiota do leite materno dessas mães (Damaceno *et al.*, 2017, 2021). O efeito benéfico *in vitro* dos isolados foi avaliado e selecionamos 9 potenciais probióticos, todos isolados de amostras de leite de mães com IMC normal. Nesse contexto, a principal hipótese desse trabalho é de que a suplementação da dieta com esses potenciais probióticos poderia reduzir a obesidade revertendo a disbiose, melhorando os parâmetros metabólicos e diminuindo os processos inflamatórios ocasionados pelo estabelecimento da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito probiótico de bactérias isoladas do leite materno humano na prevenção da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar um *screening* com as bactérias isoladas do leite materno humano em modelo de obesidade, analisando o peso corporal, consumo de alimento, perfil glicêmico e sensibilidade à insulina.

2. Avaliar o efeito do potencial probiótico em modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura, analisando o (a):

- (i) Desenvolvimento ponderal;
- (ii) IMC e Índice de Lee;
- (iii) Perfil lipídico e glicêmico;
- (iv) Sensibilidade à insulina;
- (v) Concentração de enterobactérias e BAL nas fezes por método dependente de cultivo;
- (vi) Histologia do tecido adiposo, fígado, íleo e jejuno;
- (vii) Permeabilidade intestinal;
- (viii) Parâmetros inflamatórios;
- (ix) Memória de curta duração;

3. Avaliar se o efeito protetor das bactérias analisadas pode ser transmitido para a prole, analisando o (a):

- (i) Desenvolvimento ponderal;
- (ii) IMC e Índice de Lee;
- (iii) Perfil lipídico e glicêmico;
- (iv) Sensibilidade à insulina;
- (v) MPO e EPO do fígado;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e micro-organismos

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida respeitando as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério Central da UFMG. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério e parâmetros como aeração, umidade (60-80%) e temperatura ($28\pm 1^\circ\text{C}$) também foram controlados. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (80-100 mg/kg de cetamina e 8-15 mg/kg de xilazina) (WIRTZ *et al.*, 2007). Para cada experimento foram utilizados 7 animais por grupo.

Os experimentos desse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (Anexo 1).

Os micro-organismos utilizados para a realização dos experimentos foram *Lacticaseibacillus rhamnosus* (63), *L. rhamnosus* (64), *Lactobacillus gasseri* (7), *L. gasseri* (128), *L. gasseri* (130), *L. gasseri* (133), *Leuconostoc mesenteroides* (21), *L. mesenteroides* (22) e *Bifidobacterium breve* (8), que foram isolados do leite materno e identificados por testes morfotintórias, respiratórios e bioquímicos, seguido de MALDI-TOF/MS (DAMACENO *et al.*, 2017, 2021). A cultura dos micro-organismos foi mantida a -80°C em caldo *de Man, Rogosa & Sharpe* (MRS, Difco, Sparks, USA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação foi feita em caldo MRS ou MRS suplementado com L-cisteína 0,05% (p/v) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), a 37°C , durante 24 ou 48 horas, em estufa bacteriológica ou câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, USA), contendo uma atmosfera de 85% N_2 , 10% H_2 e 5% CO_2 . Foi administrado aos animais 0,1 mL na concentração de 10^9 UFC (unidades formadoras de colônias)/mL de bactéria, por dia, por gavagem.

4.2 Dieta

Tabela 1 – Composição das dietas AIN-93M e DIO.

Ingredientes	Quantidade (g)	
	AIN-93M	DIO
Banha de porco	0	355,0
Groselha	0	310,0
Caseína	140,0	200,0
Amido de milho	465,7	62,0
Celulose	50,0	50,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Óleo de soja	40,0	20,0
Cistina	1,80	3,0
Bitartarato de colina	2,50	2,50
BHT	0,008	0,014
Sacarose	100,0	0
Maltodextrina	155,0	0

Os animais receberam diferentes dietas pelo período de oito semanas: a dieta AIN-93M ou a dieta indutora de obesidade (DIO), conforme o protocolo de Freire (2015). Na Tabela 1 está descrito a composição das dietas AIN-93M e DIO e na Tabela 2 está detalhada a distribuição energética e densidade calórica de cada uma delas.

Tabela 2 – Distribuição energética e densidade calórica das dietas AIN-93M e DIO.

	AIN-93M	DIO
Carboidratos (% calorias totais)	74,2	23,3
Proteína (% calorias totais)	15,8	14,9
Lipídeos (% calorias totais)	10,0	61,8
Calorias/g	2,76	5,21

4.3 Desenho experimental 1

Em experimentos prévios, oito bactérias com potencial probiótico foram isoladas do leite materno pelo nosso grupo de pesquisa. Foi, então, realizado uma triagem para avaliar qual dos isolados apresenta melhor resposta na redução da obesidade. Dentre os oito isolados, temos: *Lacticaseibacillus rhamnosus* (63), *L. rhamnosus* (64), *Lactobacillus gasseri* (7), *L. gasseri* (128), *L. gasseri* (130), *L. gasseri* (133), *Leuconostoc mesenteroides* (22) e *Bifidobacterium breve* (8). Dessa forma, os animais foram distribuídos entre os seguintes grupos com 4 animais em cada:

- 1) Grupo controle (CT) – Dieta AIN-93M
- 2) Grupo obeso – dieta indutora de obesidade (DIO)
- 3) Grupo obeso (DIO) + *Lacticaseibacillus. rhamnosus* (63)
- 4) Grupo obeso (DIO) + *L. rhamnosus* (64)
- 5) Grupo obeso (DIO) + *Lactobacillus. gasseri* (7)
- 6) Grupo obeso (DIO) + *L. gasseri* (128)
- 7) Grupo obeso (DIO) + *L. gasseri* (130)
- 8) Grupo obeso (DIO) + *L. gasseri* (133)
- 9) Grupo obeso (DIO) + *L. mesenteroides* (22)
- 10) Grupo obeso (DIO) + *B. breve* (8)

Os animais receberam 100 µL de salina ou probiótico por gavagem diariamente durante todo o experimento na concentração de 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Dez dias após o início do tratamento, os animais receberam as dietas AIN-93M ou DIO. A evolução da obesidade foi verificada pela pesagem semanal dos animais. O consumo alimentar foi quantificado, também, semanalmente, utilizando o cálculo da diferença entre o peso da dieta oferecida e o restante não consumido.

O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e o teste de sensibilidade à insulina foi realizado 4 e 2 dias antes da eutanásia, respectivamente. Após o sacrifício dos animais, amostras de fígado e tecido adiposo foram coletadas para o preparo de lâminas histológicas. O comprimento naso-anal foi medido no último dia para o cálculo do IMC e índice de Lee.

4.4 Desenho experimental 2

Após a triagem, os micro-organismos que apresentaram melhores resultados na redução da obesidade foram *L. gasseri* (7) e *L. rhamnosus* (64). Sendo assim, essas duas bactérias foram selecionadas para os estudos posteriores. Dessa forma, os animais foram divididos em 8 grupos, contendo 7 animais por grupo, conforme descrito a seguir:

- 1) Grupo controle – dieta AIN-93M
- 2) Grupo obeso – DIO
- 3) Grupo *L. gasseri*
- 4) Grupo *L. gasseri* + DIO
- 5) Grupo *L. rhamnosus*

- 6) Grupo *L. rhamnosus* + DIO
- 7) Grupo *L. gasseri* + *L. rhamnosus*
- 8) Grupo *L. gasseri* + *L. rhamnosus* + DIO

A evolução da obesidade e o consumo de alimento foram mensurados conforme descrito no desenho experimental 1. Ao final do tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais para retirada do sangue, fígado, tecido adiposo visceral epididimal, intestino delgado e fezes.

A partir do sangue coletado, foram avaliados os níveis séricos de triglicérides, colesterol total e colesterol HDL. Amostras do fígado, tecido adiposo e intestino foram encaminhadas para análise histológica.

Devido à relação entre obesidade e microbiota intestinal, as fezes coletadas dos animais no último dia do experimento foram utilizadas para a avaliação da expansão de enterobactérias e concentração de BAL por método dependente de cultivo. Por fim, o comprimento naso-anal foi medido para o cálculo do IMC ($\text{peso}/[\text{comprimento nasoanal}]^2$) e índice de Lee ($[\text{peso}]^{1/3}/\text{comprimento nasoanal}$).

4.5 Desenho experimental 3

Após a determinação do efeito de *L. gasseri* (7) e *L. rhamnosus* (64) em modelo de obesidade e, visto que essas bactérias foram isoladas do leite materno, foi avaliado se o efeito protetor dos potenciais probióticos poderiam ser transmitidos verticalmente para a prole. Para isso, fizemos o cruzamento de camundongos C57/BL6 machos e fêmeas de 8 semanas de idade. Após o cruzamento, as mães grávidas foram divididas em quatro grupos: CT, DIO, *L. gasseri* e *L. rhamnosus*. Durante a gestação e todo o período de amamentação, os animais do grupo CT e DIO não receberam nenhum tratamento e as mães do grupo *L. gasseri* e do grupo *L. rhamnosus* receberam, respectivamente, 0,1 mL de *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, diariamente, na concentração de 10^9 UFC/mL por gavagem oral. Após o desmame, os filhotes machos foram separados e começaram a ser alimentados com a dieta controle (grupo CT) ou DIO (grupos DIO, *L. gasseri* e *L. rhamnosus*). O peso dos animais foi mensurado semanalmente. Quatro e dois dias antes da eutanásia, foram realizados os testes de tolerância oral a glicose e de sensibilidade à insulina. Ao final de oito semanas, os animais foram eutanasiados e o sangue e o fígado foram coletados para as análises posteriores.

4.6 Teste de antagonismo

Para realização do teste de antagonismo *L. gasseri* e *L. rhamnosus* foram previamente repicados em 10mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 24h. Após 24h, foi feito um *spot* de 10µL de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* em placas de ágar MRS 1,5%, que foram em seguida incubadas a 37°C por 24h. Vinte e quatro horas depois, 10µL de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* foram adicionados em MRS ágar semissólido 0,9%. Foram adicionados 1mL de clorofórmio às placas contendo o *spot* de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* para matar os micro-organismos presentes no meio. Após a completa evaporação do clorofórmio, o MRS ágar semissólido foi vertido nas placas de MRS 1,5% e estas foram incubadas por 24h a 37°C para observação do halo de inibição.

4.7 Avaliação do perfil glicêmico

O TTOG e o teste de sensibilidade à insulina foram realizados por meio da coleta de uma gota de sangue da veia caudal, após jejum *overnight*, e a glicose foi medida utilizando um glicosímetro portátil (Accu-Check Active, Roche Diabetes Care, Brasil). A área sob a curva (ASC) foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism Version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Para o TTOG, glicose na concentração de 2 g/kg de peso corporal foram administrados aos animais por gavagem. A glicose então foi medida nos tempos 0 (antes da gavagem), 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem.

Já para o teste de sensibilidade à insulina, foi injetado i.p. 0,75 U/kg de peso corporal de insulina. A glicose foi medida nos tempos 0 (antes da injeção), 15, 30 e 60 minutos após a administração de insulina.

4.8 Avaliação do perfil lipídico

Para avaliação do perfil lipídico foram analisados os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos, de acordo com Freire e colaboradores (2016). O sangue foi coletado e armazenado em microtubos sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm durante 5 minutos para a separação do soro e armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C). As análises foram realizadas utilizando kits enzimáticos comerciais (Labtest, Brasil), em até 24 horas após a coleta, conforme descrito a seguir.

Colesterol total:

A concentração do colesterol total foi determinada por ensaio em microplaca de 96 poços. As amostras de soro (5 µL) foram diluídas em água deionizada (1:50) e 100 µL de reagente de colesterol total foram adicionados a 100 µL do soro diluído ou padrão, em duplicata. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490 nm em leitor de microplaca (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). O resultado final foi obtido mediante determinação da curva dos padrões e sua equação, e a relação desta com a absorbância das amostras e as diluições utilizadas.

HDL-colesterol:

Após centrifugação a 12000 rpm por 4 minutos, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade é determinado no sobrenadante. A microplaca de 96 poços foi montada colocando-se 10 µL do sobrenadante e 10 µL do reagente padrão, em duplicata. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Para a determinação do padrão foram substituídos 10 µL de sobrenadante de amostra por 10 µL de padrão de HDL. O cálculo das concentrações de HDL (mg/dL) foi feito multiplicando-se a absorbância média da amostra pelo fator de calibração, conforme a seguir:

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{40}{\text{média da Absorbância do Padrão}}$$

$$[\text{HDL}] = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator de calibração}$$

Triglicerídeos:

As amostras de soro (5 µL) foram diluídas em água deionizada (1:25), a fim de que as leituras de absorbância sejam adequadas à variação linear do teste. O reagente de cor (100 µL) foi adicionado a 100 µL do soro diluído. Após período de incubação de 15 minutos a 37°C a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). O resultado foi obtido mediante determinação da curva dos padrões e sua equação, e a relação desta com a absorbância das amostras e as diluições utilizadas.

4.9 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de tecnécio sestamibi-ácido dietilenoaminopentacético (^{99m}Tc -DTPA). No dia da eutanásia, alíquotas de 0,1 mL de solução de DTPA marcado com 18,5 megabecquerel (MBq) de ^{99m}Tc foram administradas, por gavagem, a todos os animais. Após 4 horas da administração, os camundongos foram anestesiados i.p. Em seguida, 500 μL de sangue foram coletados por punção cardíaca para determinação da radioatividade (Generoso *et al.*, 2011). Para os cálculos do percentual de dose no sangue, utilizamos um padrão de dose contendo o mesmo volume de ^{99m}Tc -DTPA administrado aos camundongos, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose no sangue} = \frac{\text{cpm do sangue}}{\text{cpm da dose (Padrão) administrada}} \times 100$$

cpm= contagem por minuto

4.10 Avaliação de parâmetros imunológicos

4.10.1 Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos (Vieira *et al.*, 2009). Sumariamente, fragmentos do íleo, jejuno e fígado dos animais foram removidos e congelados a -80°C . Após o descongelamento, o tecido será homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,015 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão), utilizando-se homogeneizador de tecidos (TissueLyser LT, QIAGEN), centrifugado a 10.600 g (Thermo Scientific ST16-R) por 15 minutos a 4°C . O precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 μL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaH_2PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.600 g. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO no precipitado ressuspensionado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando

tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e os resultados foram expressos pela absorbância.

4.10.2 Medida da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima EPO, como quantidade relativa de eosinófilos no tecido, foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente (Vieira *et al.*, 2009). Para tanto, para cada 100 mg de tecido hepático pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2), em seguida o tecido foi homogeneizado (TissueLyser LT, QIAGEN) e centrifugado a 10.600 g/10.000 rpm (Thermo Scientific ST16-R) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5% para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota de 1 mL que foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essa amostra foi centrifugada a 10.600 g por 15 minutos a 4°C e apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço, 75 µL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, (OPD, Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8,0 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com filtro de 492 nm, e os resultados foram expressos como UA.

4.10.3 Dosagem de imunoglobulina a secretória (sIgA)

A determinação do nível de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA (Martins *et al.*, 2007). Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com PBS, pH 7,2 e suplementado com inibidores de protease (1 µM

de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para análises posteriores. Para a determinação da sIgA foi utilizado para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA) de camundongos desenvolvidos em cabra. Para a detecção da sIgA foi utilizado anticorpo conjugado à peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, SIGMA). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e a concentração de sIgA foi expressa em μ g/g de fluido intestinal.

4.10.4 Dosagem de citocinas por ELISA

Para avaliar a expressão de citocinas (TNF e IL-10), fragmentos do tecido adiposo com aproximadamente 100 mg foram homogenizados com 1 mL de solução de extração de citocinas [PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF; 0,1 mM cloreto de benzetônio; 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20] utilizando-se homogenizador de tecidos (TissueLyser LT, QIAGEN) (Martins *et al.*, 2013). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 12.000 g e os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80 °C para posterior dosagem. A quantificação de citocinas foi realizada pelo método de ELISA e os kits para as dosagens foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante foram seguidas para a realização dos ensaios.

4.11 Análise microbiológica

Após coleta das fezes, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em função do peso, numa diluição 10^{-2} , em PBS estéril. A partir dessa diluição foram feitas novas diluições decimais no mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL destas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar *de Man, Rogosa & Sharpe* (MRS, Merck) e ágar MacConkey (Difco). As placas de ágar MRS foram incubadas a 37°C por 4 dias em anaerobiose. Já as placas de ágar MacConkey foram incubadas por 24 horas a 37°C em aerobiose. Após a incubação e contagem das colônias crescidas, os dados foram apresentados em \log_{10} UFC/g de fezes. A lista dos meios e condições de cultura e finalidades de cada um está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Meios e condições de cultura para análise qualitativa e quantitativa do conteúdo intestinal dos animais.

Meio de cultura	Atmosfera	Tempo de incubação	Micro-organismos
Ágar MRS	Anaerobiose	Até 4 dias	Bactérias ácido-lácticas
Ágar McConkey	Aerobiose	24 horas	Enterobactérias

4.12 Análises histológicas

A retirada dos tecidos para as análises histológicas foi realizada no dia da eutanásia, em que foram coletados o tecido adiposo epididimal, fígado, jejuno e íleo. O íleo e o jejuno foram estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e aberto pela borda anti-mesentérica e todo o seu conteúdo retirado de forma cautelosa para não danificar a mucosa. Eles então foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambos), da porção distal em direção à proximal. Os rolos, assim como pedaços do tecido adiposo e fígado, foram colocados em cassetes e fixados em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. No dia seguinte ao preparo das amostras, os cassetes imersos na solução de formol foram encaminhados para um laboratório de patologia para a confecção das lâminas histológicas. As amostras foram processadas para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica. O *score* utilizado para mensurar o grau de esteatose no fígado foi em relação aos focos de esteatose no órgão (1- focal, 2- multifocal e 3- difuso) e ao tamanho dos das gotas de gordura no órgão (1- discreto, 2- moderado e 3- acentuado), podendo totalizar o valor de 6 por animal.

4.13 Avaliação comportamental dos animais submetidos à dieta hiperlipídica: teste de campo aberto e realocação de objetos

Campo aberto

O campo aberto foi utilizado para avaliar as características locomotoras e atividade exploratórias induzidas por um novo ambiente (Barros, 2022). A tendência natural do animal em um novo ambiente é explorá-lo, apesar do estresse e do conflito causados pelo novo ambiente (Prut; Belzung, 2003). O aparato consistiu em uma

arena aberta feita de acrílico branco liso com 40 cm × 40 cm × 50 cm. Os animais foram colocados no centro do aparato e lhes foi permitido livre exploração durante 10 minutos. Uma câmera de vídeo localizada acima do aparato registrou o comportamento dos animais durante o teste para posterior análise. A distância total percorrida foi avaliada com o auxílio do software ANY-maze™.

Realocação de objetos

A memória espacial de curto prazo dos camundongos foi avaliada por meio do teste de realocação de objetos (Barros, 2022). O teste baseia-se na tendência natural dos roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, de posteriormente explorar um dos objetos - reposicionado em um novo local — por mais tempo do que exploram o objeto não deslocado (Assini; Duzzioni; Takahashi, 2009). Esse teste foi realizado posteriormente ao teste do campo aberto, de forma que o aparato do campo aberto já fosse familiar aos animais. Na sessão de treino, dois objetos de plástico idênticos foram apresentados aos animais. Os objetos foram colocados a 7 cm de distância das paredes do campo aberto e foi permitida a exploração dos objetos pelos animais durante 5 minutos. As interações dos animais com os objetos foram gravadas com uma câmera de vídeo localizada acima do aparato. Decorridos os 5 minutos, os animais foram retirados do aparato e voltaram para as suas respectivas caixas-moradia. Transcorridos 30 minutos, os animais foram reexpostos ao aparato; contudo, nessa sessão de teste, um dos objetos foi movido para um novo local na caixa. O tempo gasto pelos animais explorando os objetos na localização conhecida (T_{familiar}) e localização nova (T_{novo}) foram gravadas ao longo dos 5 minutos. Todas as localizações dos objetos foram contrabalançadas entre os grupos. A exploração dos objetos foi registrada usando um cronômetro quando os animais cheiravam ou tocavam o objeto enquanto olhavam para o mesmo (ou seja, quando a distância entre o nariz e o objeto tinha menos de 1 cm). Um índice de exploração foi calculado conforme descrito anteriormente (Assini; Duzzioni; Takahashi, 2009): $(T_{\text{novo}} \times 100)/(T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}})$, onde T_{novo} é o tempo gasto explorando o objeto deslocado e T_{familiar} é o tempo gasto explorando o objeto não deslocado.

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de *Student*. Para comparação da variância entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA ajustado pelo teste de Tukey e

no caso de distribuições assimétricas foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%. Para realização dos testes foi utilizado o software GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obesidade é um problema global de saúde pública que triplicou sua prevalência nas últimas três décadas, provavelmente, devido à urbanização, sedentarismo e o aumento do consumo de alimentos processados ricos em açúcar e gordura (Tiwari; Balasundaram, 2022). Dessa forma, a busca por novas terapias é necessária para expandir o leque de tratamentos para pacientes com obesidade, e a pesquisa por novos probióticos vêm ganhando destaque como um tratamento adjuvante nesses casos.

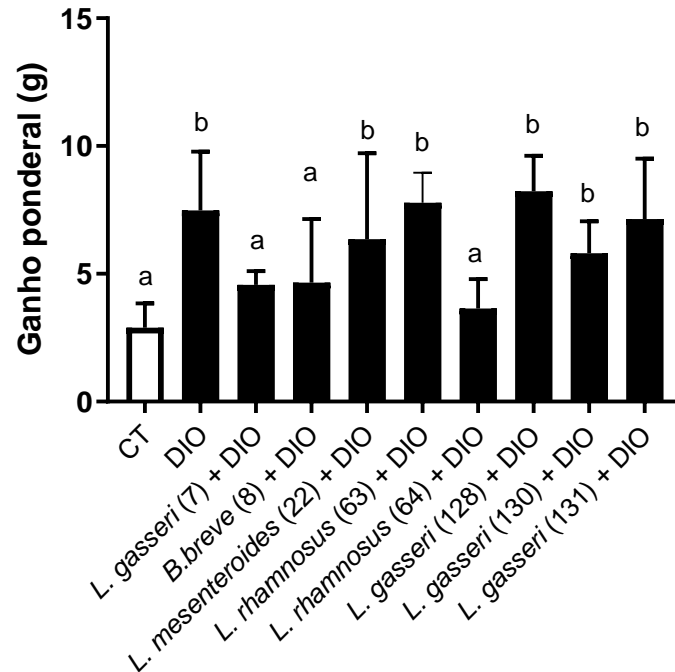
Em trabalhos anteriores do nosso grupo (Damaceno *et al.*, 2017, 2021), bactérias com potencial probiótico foram isoladas do leite de materno humano e, curiosamente, esses micro-organismos foram isolados apenas de mães com o IMC normal, enquanto mães com sobrepeso/obesas não apresentaram tais bactérias. Um estudo conduzido por Isganaitis e colaboradores (2019), demonstrou que há diferenças na composição do metaboloma do leite materno de mães com peso normal e mães com sobrepeso, e que essa diferença poderia impactar, também, a composição e diversidade da microbiota desse mesmo leite.

Sendo assim, nosso trabalho se divide em dois objetivos: 1) analisar o potencial probiótico de bactérias isoladas do leite materno na redução de obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica em modelo murino e 2) analisar se esse efeito protetor é passado verticalmente da mãe para filhote.

5.1 *Screening* das bactérias isoladas do leite materno em modelo de obesidade

Foi realizado um *screening* para avaliar qual das bactérias isoladas do leite materno apresentava melhor resultado na redução da obesidade. A prevenção do ganho de peso foi observada de forma significativa apenas nos animais administrados com as bactérias *L. gasseri* (7), *B. breve* (8) e *L. rhamnosus* (64) quando comparados com o grupo obeso (DIO). Não houve diferença significativa quando esses grupos eram comparados com o grupo controle (CT). Não houve diferença significativa no consumo de alimento entre os grupos.

Figura 3 – Representação do ganho ponderal. Grupo controle foi alimentado com dieta controle (AIN-93M) e demais grupos com DIO (n=4). Os animais foram tratados com 0,1 mL de salina 0,9% estéril ou respectivas bactérias isoladas do leite materno na concentração de 10^9 UFC/mL por gavagem oral diariamente. A análise estatística foi feita utilizando One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Dessa forma, as bactérias que apresentaram resultados mais promissores na redução da obesidade foram as bactérias *L. gasseri* (7), *B. breve* (8) e *L. rhamnosus* (64). Trabalhar com as três bactérias durante o doutorado seria inviável, pois o número de grupos experimentais seria grande. Assim, optamos por desenvolver o projeto com as bactérias *L. gasseri* (7) e *L. rhamnosus* (64). O efeito protetor de *B. breve* (8) em modelo de obesidade será avaliado em projetos futuros.

-5.2 A administração de *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, mas não o mix das duas bactérias, foi capaz de prevenir o ganho ponderal e o aumento do Índice de Lee, mas não o IMC, em modelo de obesidade em camundongos

Após a seleção de *L. gasseri* (7) e *L. rhamnosus* (64) em modelo de obesidade, investigamos o efeito protetor dessas bactérias na prevenção do ganho de peso e do seu impacto no IMC e índice de Lee. Com relação ao ganho ponderal, as bactérias preveniram o ganho de peso de forma significativa em comparação ao grupo DIO ($p < 0,05$), mantendo o peso dos animais semelhante aos do grupo controle onde não foi observada diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) (figura 4A). Não houve

diferença significativa no consumo de alimento entre os grupos (dados não mostrados). A respeito do índice de Lee, o grupo DIO apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e essa diferença também foi observada em relação aos grupos *L. gasseri* + DIO e *L. rhamnosus* + DIO (figura 4B). Atualmente, não há um consenso sobre a melhor forma de avaliar a obesidade em ratos e camundongos, porém o Índice de Lee é o método mais comumente utilizado para esse propósito (Jia *et al.*, 2018). Nossos achados corroboram com outros estudos onde foi observado que a administração de linhagens de *Lactobacillus* reduziram significativamente parâmetros de adiposidade, como o Índice de Lee e peso corporal em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Khanna *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Wang, Miao *et al.*, 2020). A melhora nesses parâmetros pode estar associada à inibição de lipases de lipoproteínas pelos probióticos que, por sua vez, pode ter inibido a captação de ácidos graxos pelos adipócitos, resultando em menor acúmulo de gordura e prevenindo o ganho de peso (Khanna *et al.*, 2020).

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à análise do IMC (figura 4C). A obesidade e sobrepeso são definidos pela Organização Mundial de Saúde considerando o valor do IMC (peso corporal em kg dividido pela altura ao quadrado kg/m^2). Porém, esse dado não é totalmente confiável uma vez que ele leva em consideração o peso do indivíduo como um todo, tanto massa magra quanto gordura; dessa forma, um indivíduo que possui hipertrofia muscular pode ser erroneamente classificado como obeso segundo esse parâmetro (Wong *et al.*, 2021). O percentual de gordura corporal é o valor total da massa de gordura dividido pelo total da massa corporal do indivíduo e multiplicado por 100; esse parâmetro traz mais confiabilidade para definição da obesidade e nos próximos experimentos faremos o cálculo desse parâmetro para avaliar o efeito anti-obesidade das bactérias testadas como uma alternativa ao IMC.

Como as duas bactérias apresentaram efeito protetor após o *screening*, visamos avaliar também se a administração conjunta de *L. gasseri* e *L. rhamnosus* poderia potencializar o grau de proteção nos camundongos tratados. Interessantemente, quando o mix de bactérias é administrado aos camundongos, o efeito protetor das bactérias desaparece, visto que, não houve prevenção do ganho ponderal e não houve melhora nos parâmetros de avaliação da obesidade, como IMC e índice de Lee. Isso pode estar associado a um efeito antagônico entre as duas bactérias onde uma inibe o crescimento da outra, havendo assim, a inibição ou

neutralização do efeito protetor dos micro-organismos em modelo de obesidade. No teste de antagonismo, observamos que *L. rhamnosus* inibiu o crescimento de *L. gasseri* devido ao halo de inibição formado em volta do spot central (Figura 5 esquerda). Já *L. gasseri* não foi capaz de inibir o crescimento de *L. rhamnosus* na mesma intensidade, porém é possível observar que em volta do spot central há uma transparência leve, indicando que houve um pequeno grau de inibição (Figura 5 direita). Além da inibição mútua, a redução do efeito protetor da mistura dos micro-organismos pode também estar associada à competição por nutrientes ou sítios de ligação no TGI.

Figura 4 – Análise do ganho ponderal dos animais **(A)**, do índice de Lee **(B)** e índice de massa corporal (IMC) **(C)**. Os animais foram alimentados com a dieta controle (AIN-93M) ou dieta indutora de obesidade (DIO). Os animais receberam 0,1 mL de salina 0,9% estéril ou *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* ou a combinação de *L. gasseri* + *L. rhamnosus* na concentração de 10^9 UFC/mL por gavagem oral diariamente. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

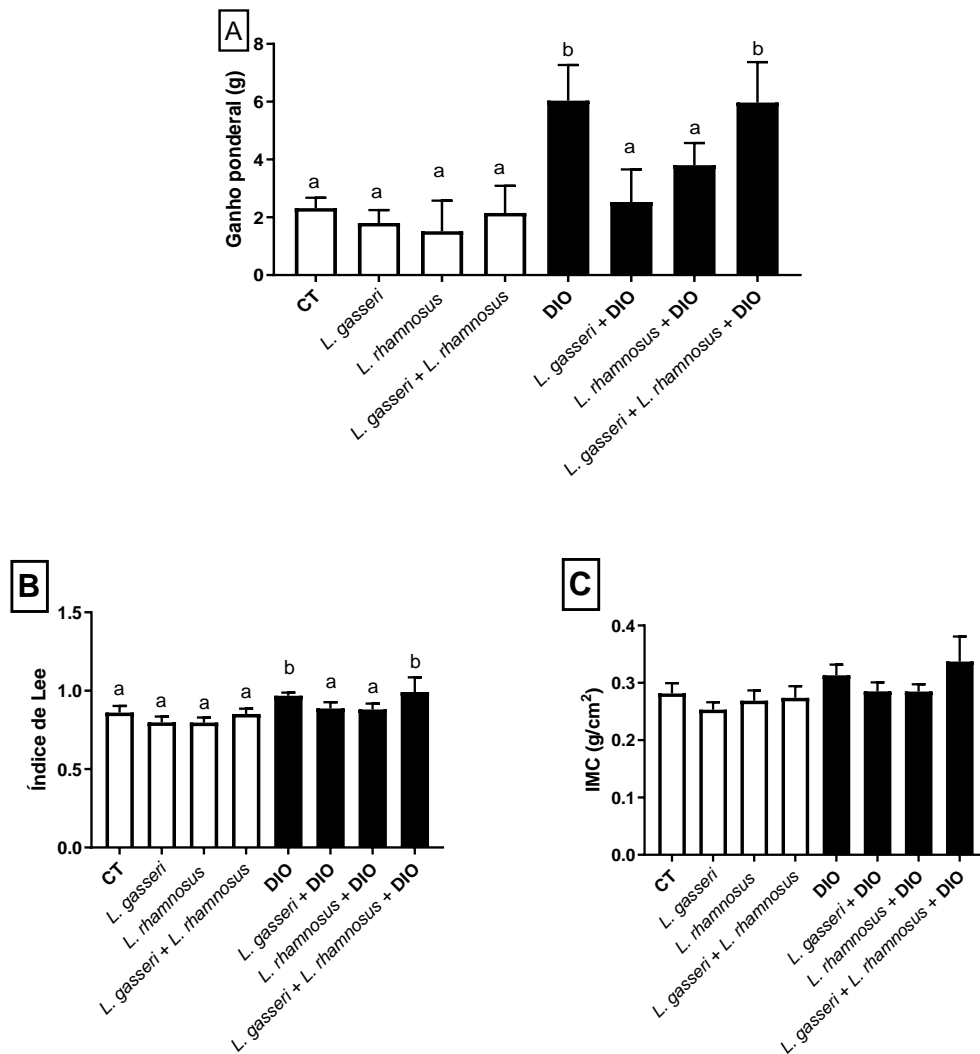
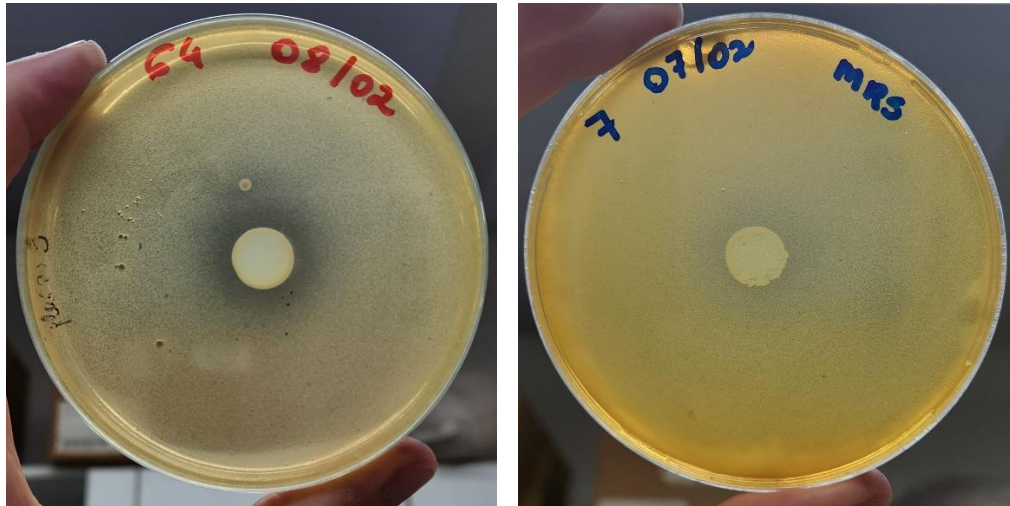


Figura 5 – Teste de antagonismo entre as bactérias *L. gasseri* e *L. rhamnosus*. Após cultivo de 24 horas em caldo MRS de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus*, um spot 10µL dessa cultura foi pipetado em meio MRS ágar 1,5% e incubado a 37°C por 24 horas. Após 24 horas, 1mL de clorofórmio foi utilizado para matar as bactérias presentes no spot. Em seguida, foi preparado ágar semissólido 0,9% onde 10µL da cultura de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* foi repicado. O ágar semissólido foi então vertido no meio MRS ágar 1,5% e incubado 24 horas a 37°C para posterior observação do halo de inibição.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.3 Avaliação dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos

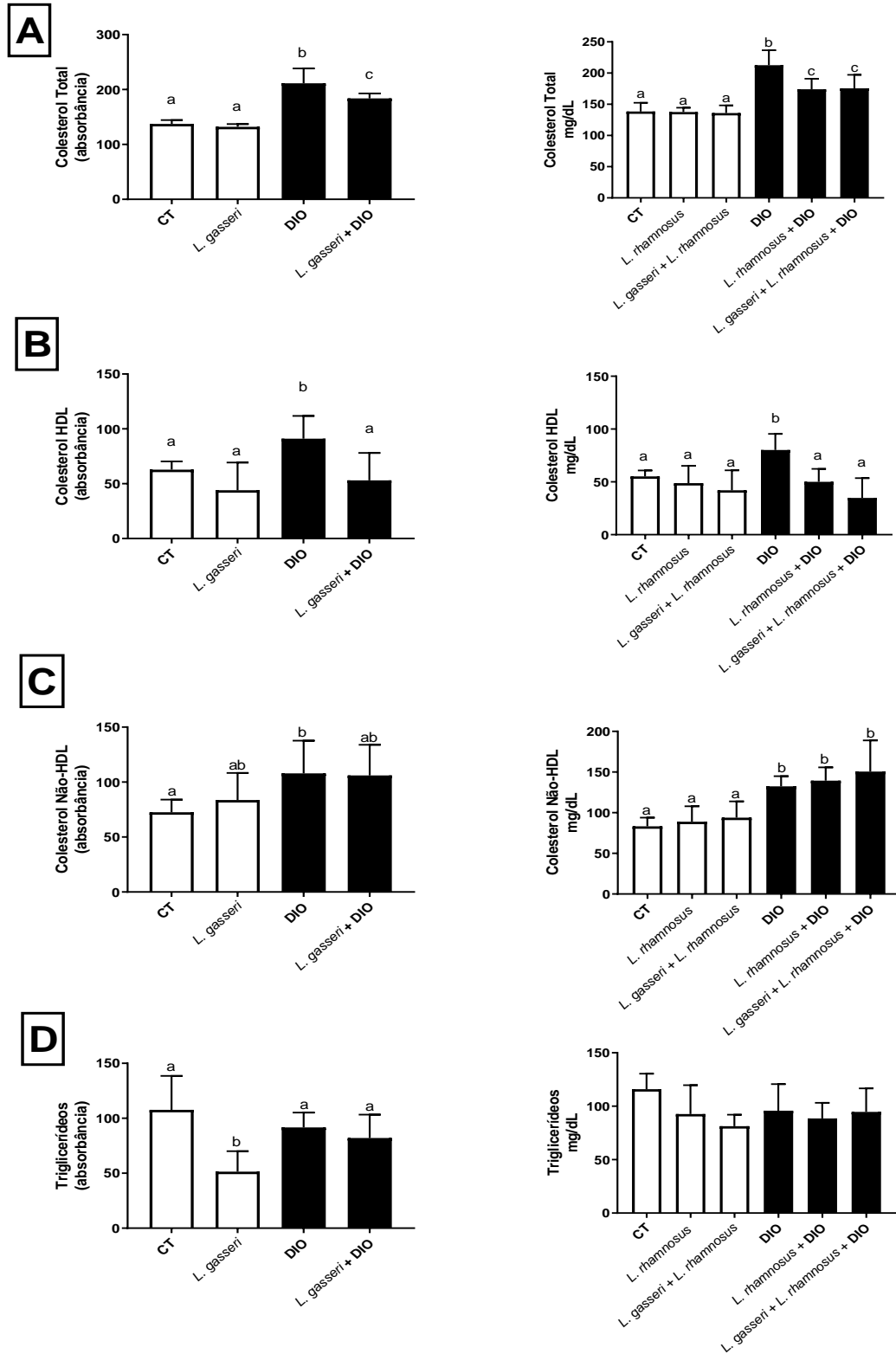
O alto consumo de uma dieta hiperlipídica tem como consequência o aumento dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos. Dessa forma, visamos analisar o efeito de bactérias isoladas do leite materno na redução dos níveis dessas substâncias. Nesse trabalho a administração de *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, mas não o mix das bactérias, preveniu o ganho de peso nos animais. Em casos de obesidade, a perda de peso resulta na diminuição dos níveis de colesterol total e aumento dos níveis de colesterol HDL, o que está relacionado à diminuição do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, derrame e diabetes (Sowers, 2003). A DIO aumentou significativamente os níveis de colesterol total em relação ao grupo controle (figura 6A). A administração de *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, por sua vez, manteve os níveis vistos no grupo controle, porém diminuiu significativamente em comparação ao grupo DIO ($p < 0,05$) e o mesmo foi observado no grupo tratado conjuntamente com as duas bactérias. Uma hipótese para isso seria o fato de bactérias do ácido lático produzirem ácidos graxos de cadeia curta no intestino como produto do seu metabolismo e esses ácidos graxos têm a capacidade de diminuir os níveis séricos de colesterol por meio

da inibição da síntese de colesterol ou redistribuindo o colesterol do plasma sanguíneo para o fígado (Ichim; Patel; Shafer, 2016).

Os níveis de colesterol HDL estavam aumentados significativamente no grupo DIO em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 6B) e o tratamento com *L. gasseri*, *L. rhamnosus* e o mix das duas bactérias diminuiu significativamente esses níveis em relação ao grupo DIO, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle. O consumo da dieta hiperlipídica acarreta aumento dos níveis de colesterol independente de qual tipo ele seja. Interessantemente, a administração de bactérias com potencial probiótico diminuiu os níveis de colesterol, inclusive o HDL. Em humanos, a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP, sigla em inglês) reduz a concentração de colesterol HDL no plasma sanguíneo; camundongos, por sua vez, são animais normalmente deficientes dessa proteína e por isso possuem altas concentrações de colesterol HDL no plasma (Hime, 2010). Dessa forma, a maior parte do colesterol nesses animais é transportado na forma HDL (Palmisano *et al.*, 2021). Isso indica que a administração dos probióticos foi benéfica ao diminuir os níveis de colesterol no plasma.

Com relação ao colesterol não-HDL, a DIO aumentou significativamente esses níveis em todos os grupos tratados com a dieta em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 6C) e o tratamento com as bactérias não foi capaz de reverter esse quadro. Não houve diferença significativa entre nenhum grupo no que diz respeito aos níveis de triglicerídeos (figura 6D). Diversos estudos têm demonstrado o efeito da administração de probióticos sobre os níveis de triglicerídeos e perfil lipídico, porém os resultados não são homogêneos, visto que os benefícios dos probióticos são linhagem-dependente e doença-dependente (Cao *et al.*, 2019; Cho; Kim, 2015; Ichim; Patel; Shafer, 2016; Xiao *et al.*, 2003).

Figura 6 – Avaliação dos níveis séricos de colesterol total **(A)**, colesterol HDL **(B)**, colesterol não-HDL **(C)** e triglicerídeos **(D)**. Os animais foram alimentados com a dieta controle (AIN-93M) ou dieta indutora de obesidade (DIO). Os animais receberam 0,1 mL de salina 0,9% estéril ou *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* ou a combinação de *L. gasseri* + *L. rhamnosus* na concentração de 10^9 UFC/mL. ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



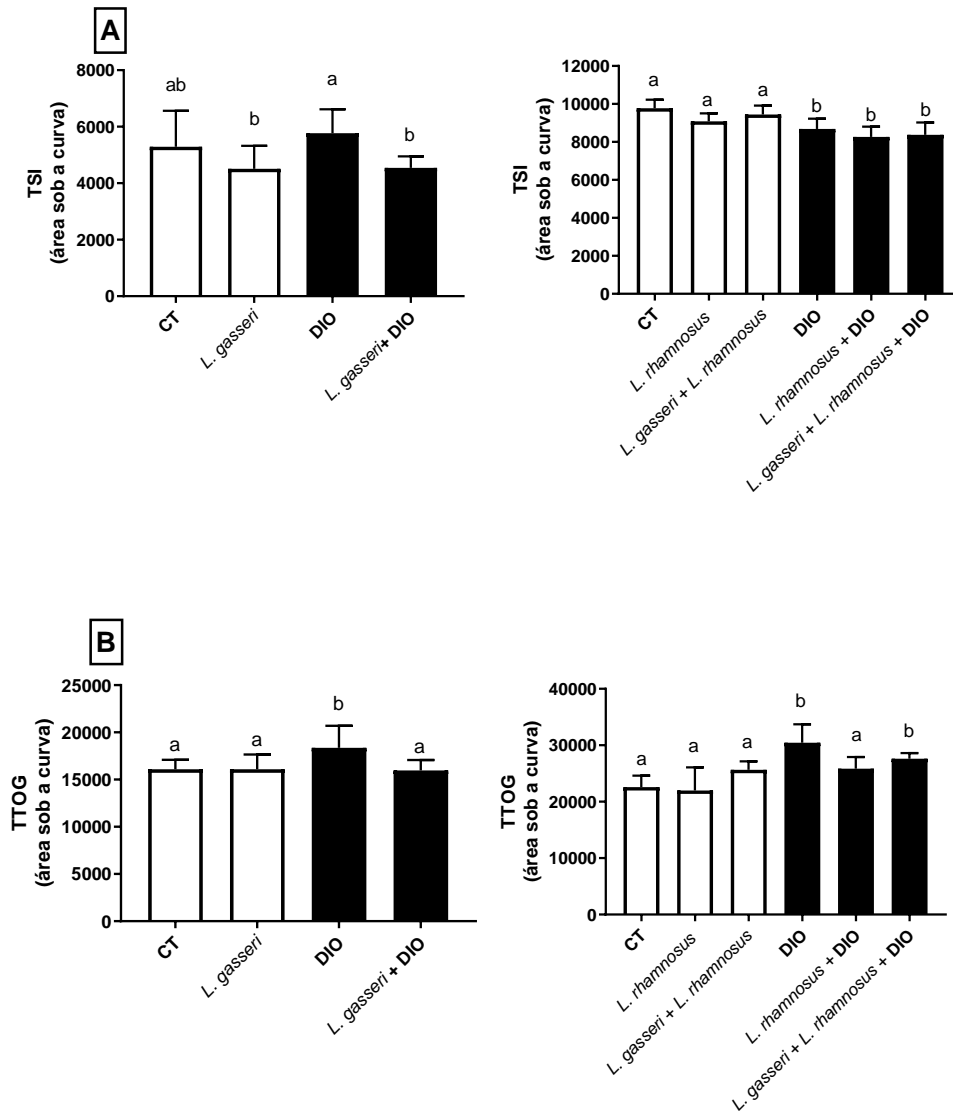
5.4 Impacto do tratamento de *L. gasseri* e *L. rhamnosus* no perfil glicêmico em modelo murino de obesidade

A ingestão de uma dieta hiperlipídica pode acarretar intolerância à glicose e na resistência à insulina. O tecido adiposo é um órgão endócrino sensível à insulina e que é responsável por regular o metabolismo de glicose e lipídeos via lipólise ou lipogênese, de acordo com a demanda do organismo (Kim *et al.*, 2019). Diversas doenças estão associadas à resistência à insulina e à intolerância à glicose, como diabetes mellitus tipo 2, obesidade e síndrome metabólica, sendo esses parâmetros analisados para avaliar o desenvolvimento dessas doenças. Quando os níveis séricos de glicose estão constantemente elevados, devido ao consumo de uma dieta rica em açúcar e gordura, por exemplo, o pâncreas produz mais insulina para que as células possam captar toda essa glicose; porém, com o passar do tempo, as células param de responder à insulina, diminuindo a sensibilidade das células a esse hormônio. Assim, altos níveis de insulina são necessários para obter uma resposta metabólica que em condições normais não seria preciso, acarretando no quadro de resistência à insulina (Antoniolli *et al.*, 2018). Assim, analisamos o efeito de bactérias isoladas do leite materno na melhora do perfil glicêmico de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica. Nesse trabalho, a administração de *L. gasseri* reverteu o quadro de resistência à insulina. Com relação ao teste de sensibilidade à insulina (TSI), o grupo tratado com *L. gasseri* foi significativamente mais sensível à insulina quando comparado ao grupo DIO ($p < 0,05$) (figura 7A), revertendo o quadro de resistência a esse hormônio. Porém, o tratamento com *L. rhamnosus* e o mix das duas bactérias pareceram não ter efeito sobre esse parâmetro. A resistência à insulina se deve a uma mudança no perfil de células imunes no tecido adiposo de indivíduos obesos, em que há a conversão de macrófagos M2 anti-inflamatórios em macrófagos M1 pró-inflamatórios (Khanna *et al.*, 2022). Assim, nós hipotetizamos que o tratamento com *L. gasseri* possa ter diminuído a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e, conseqüentemente, o estado pró-inflamatório, melhorado a sensibilidade a insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

A ativação de macrófagos pró-inflamatórios M1 no tecido adiposo acarreta aumento da produção de citocinas e quimiocinas que levam à ativação da via de sinalização NF- κ B, resultando na inibição da fosforilação do substrato do receptor de insulina e, conseqüentemente, da cascata de sinalização desse hormônio dentro da célula, impossibilitando a ação da insulina (Wellen; Hotamisligil, 2005). Como

consequência há uma diminuição da captação da glicose presente no sangue levando a um quadro de hiperglicemia e intolerância à glicose, aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares (Wang *et al.*, 2022). O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) é um teste sensível e amplamente usado para medir a tolerância à glicose por um período de 2 horas após a administração oral da substância; entretanto, melhor do que medir os níveis de glicose em um determinado ponto, seria medir a variação dos níveis séricos de glicose durante todo o período do teste; assim, o cálculo da ASC (área sob a curva) vem sendo utilizado pois ele mede a variação glicêmica do indivíduo durante o teste e atesta a eficácia de medicamentos para controlar a hiperglicemia pós-prandial (Sakaguchi *et al.*, 2016). Nesse estudo, o consumo da DIO ocasionou em menor tolerância à glicose indicada pelo aumento da ASC em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 7B) e a administração de *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, mas não o mix das bactérias, protegeu os animais diminuindo a ASC, em comparação ao grupo DIO ($p < 0,05$), e tornando-os tolerantes à glicose e prevenindo-os de iniciar um estado diabético. Estudos mostram que a administração de probióticos tem efeito benéfico na normalização do perfil glicêmico e na sensibilidade à insulina em animais alimentados com uma dieta hiperlipídica (Bagarolli *et al.*, 2017; Balakumar *et al.*, 2018; Cho; Kim, 2015; Ruan *et al.*, 2015). Isso pode estar associado a uma menor infiltração de macrófagos no tecido adiposo, modulação da microbiota, diminuindo os níveis sistêmicos de LPS ou aumento da produção de acetato, um AGCC que inibe o acúmulo de gordura e inflamação em roedores obesos ou diabéticos (Wang *et al.*, 2014).

Figura 7 – Avaliação da área sob a curva para os testes de sensibilidade à insulina (TSI) **(A)** e de tolerância oral à glicose (TTOG) **(B)**. A análise foi feita através da medição da glicose através de uma gota de sangue caudal nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos para o TSI e nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos para o TTOG. A área sob a curva foi calculada para cada animal e os valores obtidos foram utilizados para a construção do gráfico. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 Avaliação do impacto de uma dieta hiperlipídica na concentração de enterobactérias e BAL nas fezes de camundongos tratados com DIO

O consumo de uma dieta rica em gordura saturada e açúcar está associada ao desenvolvimento de um quadro de disbiose intestinal, que está diretamente associada ao aumento da população de enterobactérias e diminuição de BAL. O LPS é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativo, como as enterobactérias,

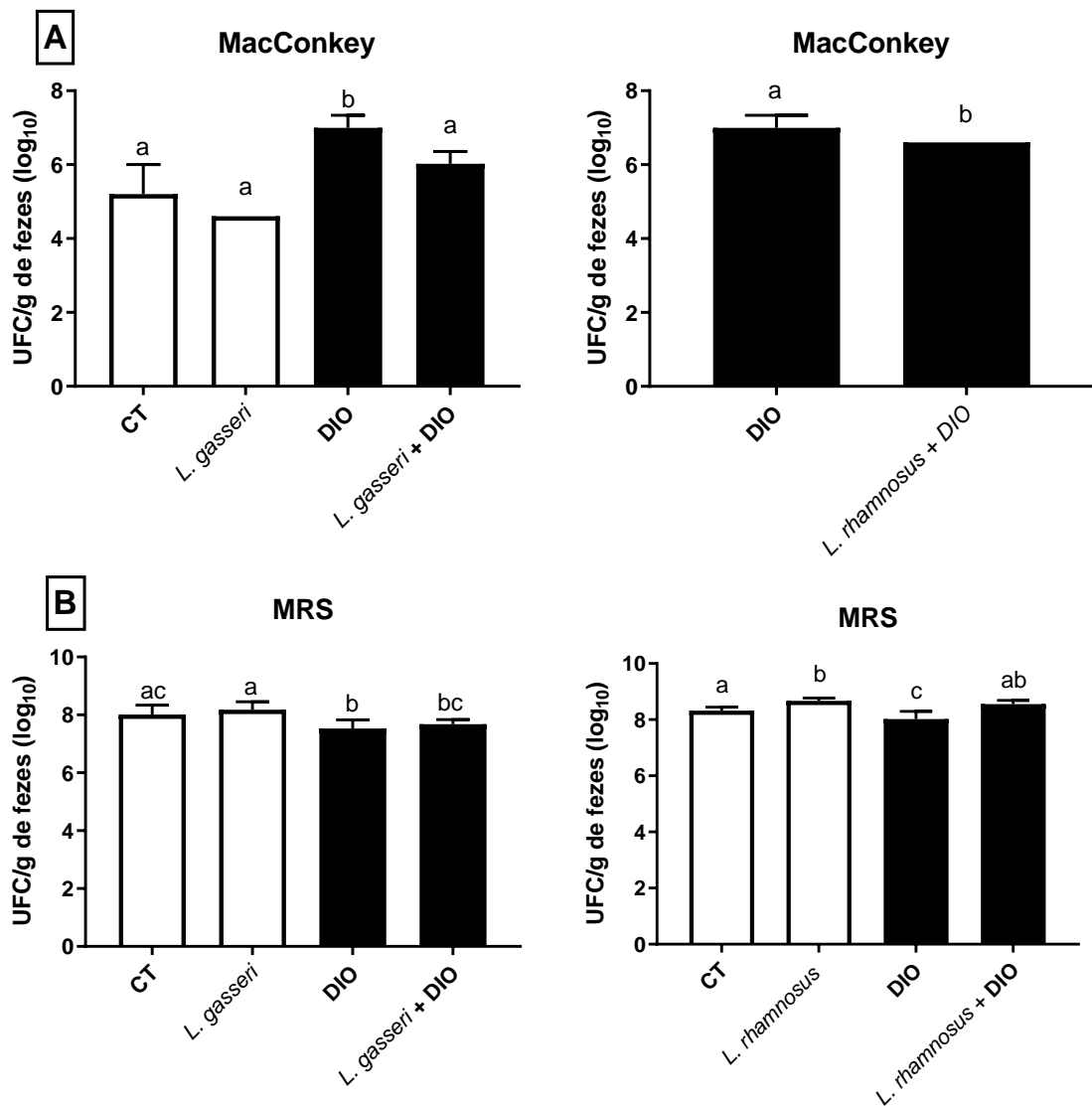
que caem na circulação sistêmica devido à ruptura da barreira epitelial ocasionada pela ingestão crônica de gordura. O aumento dos níveis de LPS circulantes está associado ao aumento de marcadores inflamatórios, resultando em uma inflamação crônica de baixo grau do tecido adiposo e desenvolvimento da obesidade. Ao analisarmos o efeito da DIO sobre a microbiota de camundongos tratados com dieta hiperlipídica, foi observado que o consumo de DIO acarretou a expansão de enterobactérias enquanto a administração de *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* acarretou a prevenção da expansão desses micro-organismos de forma significativa ($p < 0,05$) (figura 8A). Além da diminuição da concentração de enterobactérias, o probiótico diminuiu a frequência desses micro-organismos dentro do grupo tratado com *L. gasseri*. Após a indução da obesidade, os níveis de enterobactérias aumentaram 20 vezes. Após o tratamento com *L. gasseri* e *L. rhamnosus*, essa concentração diminuiu 10 e 5 vezes, respectivamente. A diminuição do número de enterobactérias pode estar relacionada à diminuição do acúmulo de gordura no tecido adiposo, e, conseqüentemente, prevenção do ganho de peso nos camundongos tratados com o probióticos, uma vez que menores concentrações dessas bactérias implicam em menores níveis de LPS na corrente sanguínea.

Com relação a concentração de BAL, o consumo da dieta hiperlipídica acarretou a diminuição desse parâmetro de forma significativa no grupo DIO em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (figura 8B). Em contraste, o tratamento com *L. rhamnosus* aumentou significativamente a concentração desse grupo de bactérias ($p < 0,05$). Apesar da ausência de diferença significativa entre o grupo tratado com *L. gasseri* e o grupo DIO, a frequência desses micro-organismos aumentou no grupo tratado. No grupo DIO a frequência era de 7 em 10 animais e no grupo tratado essa frequência subiu para 8 em 9, o que corresponde a um aumento de 26%. O aumento na concentração de BAL pode ter impactado positivamente a melhora da obesidade nos animais, pois esses micro-organismos são capazes de promover a homeostase intestinal, promover o metabolismo lipídico, diminuir os níveis de lipídeos e colesterol no sangue e fortalecer a barreira intestinal (Zhang *et al.*, 2022). Todos esses fatores contribuem para a diminuição do acúmulo de gordura e redução do peso dos animais.

Dessa forma, a administração dos potenciais probióticos influenciou positivamente melhorando o quadro de disbiose, uma vez que, nos grupos tratados, foi observada uma diminuição da concentração de enterobactérias e aumento de BAL.

BAL são responsáveis pela produção de ácidos, como o ácido lático, que acidificam o lúmen intestinal e controlam a população de enterobactérias.

Figura 8 – Avaliação da concentração de enterobactérias **(A)** e bactérias do ácido lático (BAL) **(B)** nas fezes dos animais. No dia anterior à eutanásia, as fezes foram coletadas, diluídas serialmente e plaqueadas em meio MacConkey e MRS para contagem de enterobactérias e LAB, respectivamente. Após a incubação, a contagem de colônias foi feita e os dados foram expressos em UFC/g de fezes. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

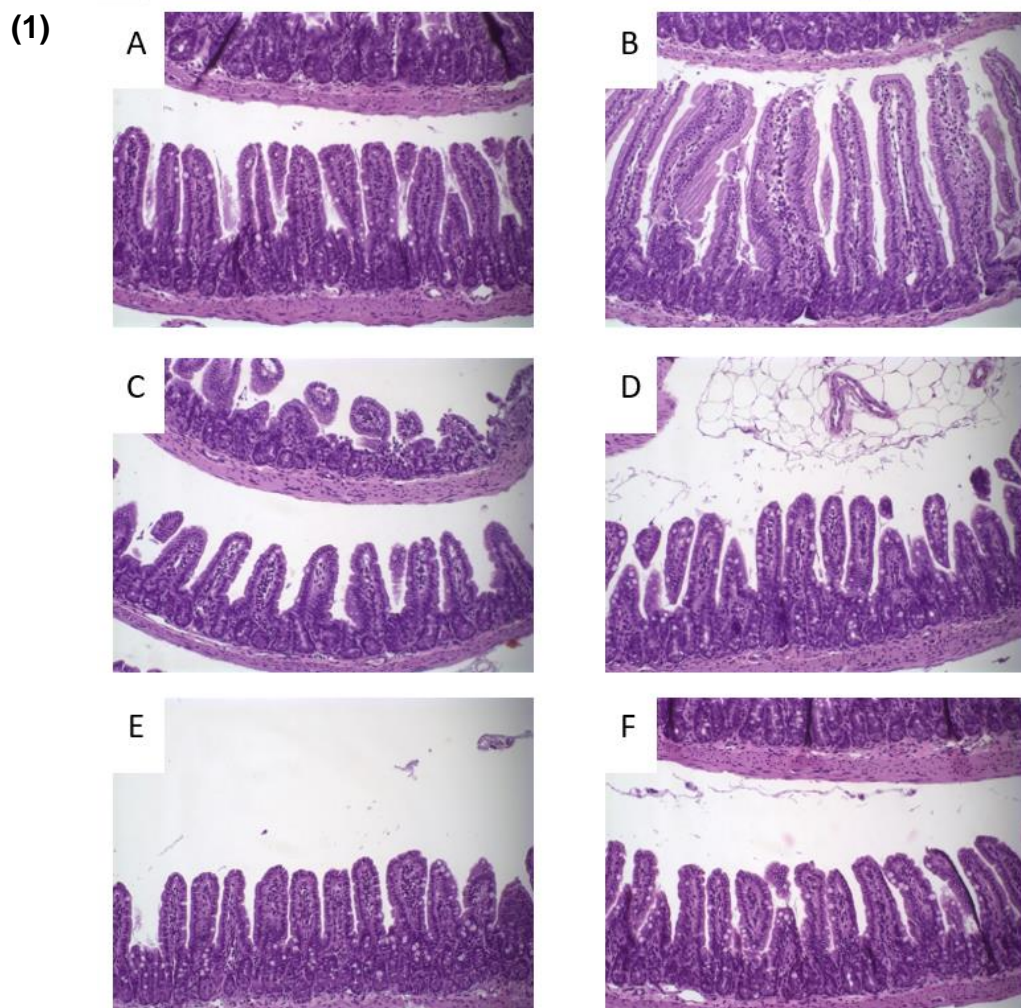


Fonte: Elaborado pelo autor

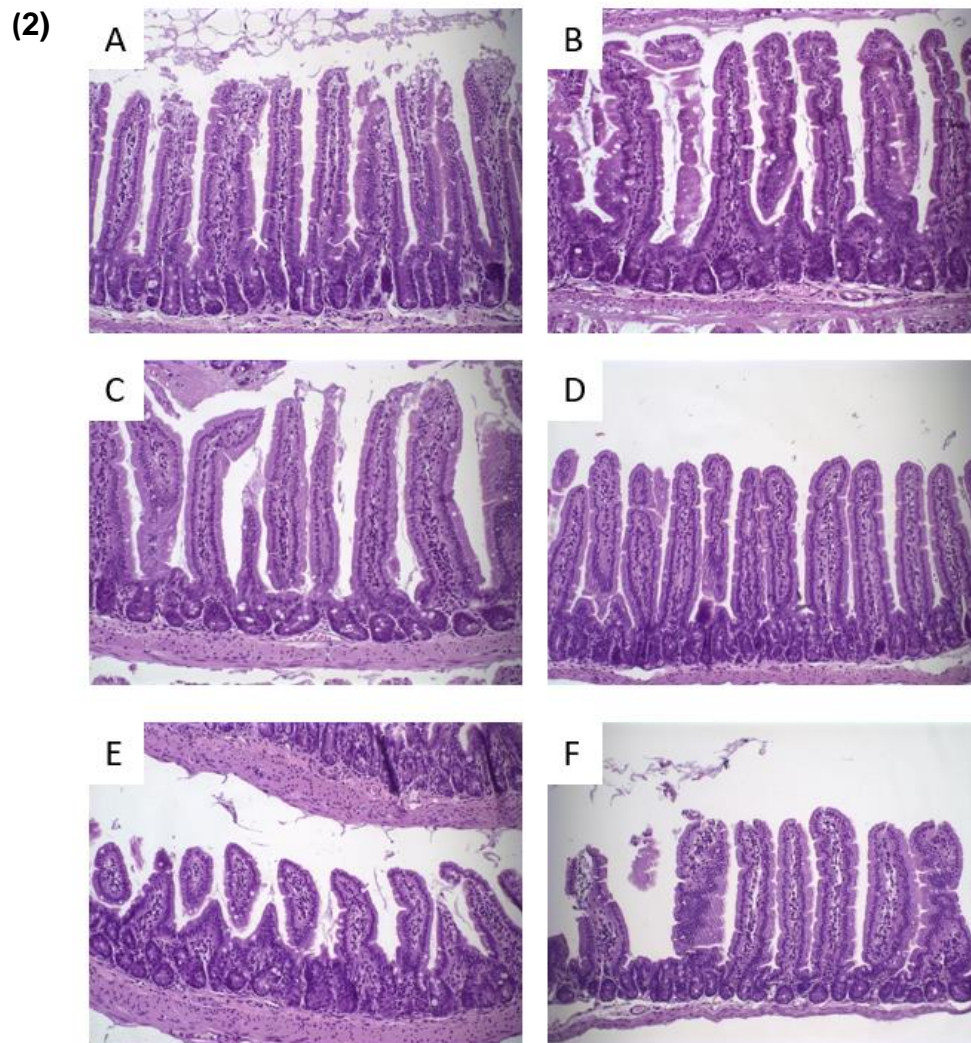
5.6 Avaliação histológica e de parâmetros inflamatórios do impacto da dieta hiperlipídica sobre o intestino

Após avaliar o efeito da dieta hiperlipídica sobre a microbiota intestinal, nós avaliamos o efeito dessa dieta sobre a mucosa intestinal e tecidos hepático e adiposo. Com relação à mucosa intestinal, não observamos diferenças significativas nos cortes histológicos do íleo e jejuno entre os grupos (figura 9).

Figura 9 – Corte histológico do íleo (1) e jejuno (2). Animais foram submetidos à dieta controle (AIN-93) ou dieta hiperlipídica por oito semanas e receberam 0,1mL de salina 0,9% ou probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL. Após a eutanásia, o tecido foi retirado e fixado em formol tamponado 10%. As lâminas histológicas foram coradas em HE. Aumento 20x. Grupos: (A) Controle; (B) DIO; (C) *L. gasseri*; (D) *L. gasseri* + DIO; (E) *L. rhamnosus*; (F) *L. rhamnosus* + DIO.



- Fonte: Elaborado pelo autor

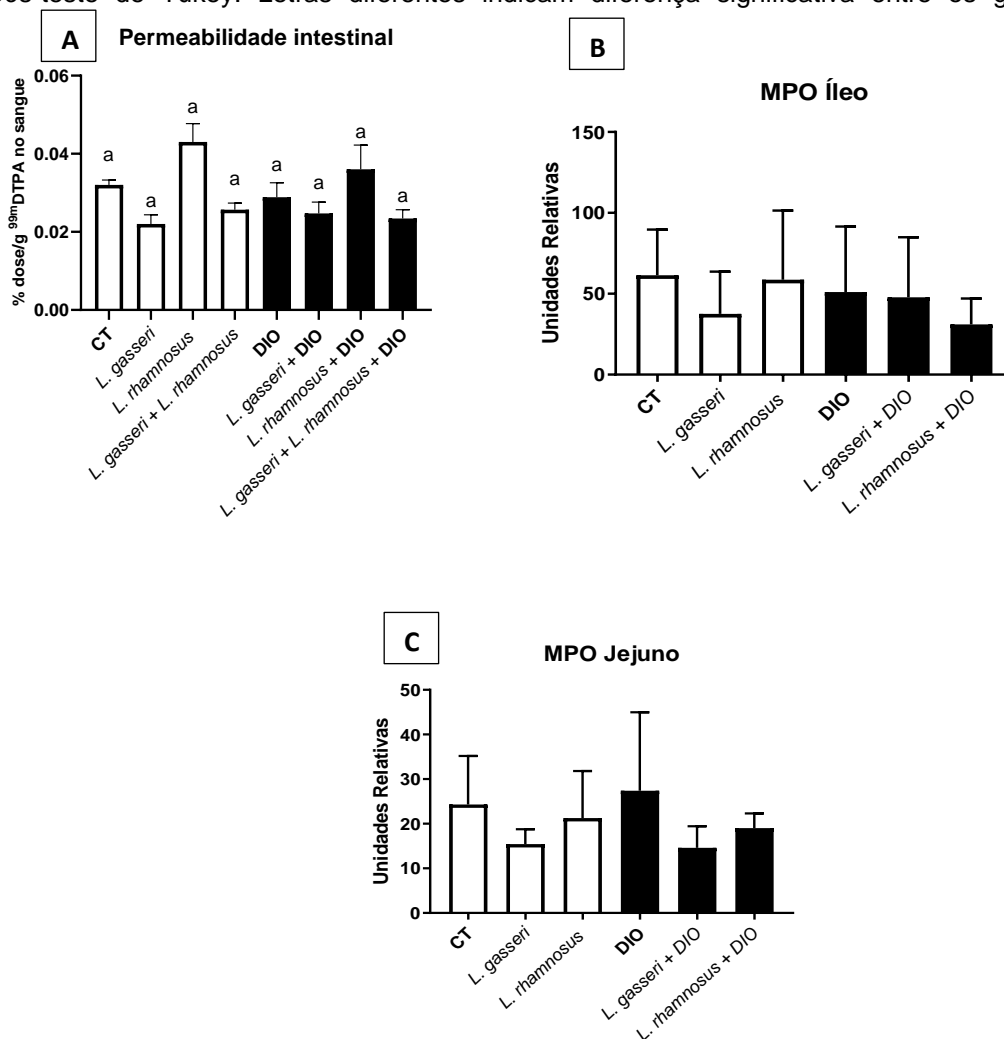


- Fonte: Elaborado pelo autor

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente em neutrófilos e a medição da sua atividade no tecido está relacionada ao influxo de neutrófilos para este e, conseqüentemente, o grau de inflamação tecidual. Em nosso estudo, não observamos diferença significativa entre os grupos com relação a atividade da MPO tanto no íleo quanto no jejuno. Esse resultado se correlaciona com o observado nas análises histológicas do jejuno e íleo, onde não foi observado infiltrado inflamatório e perda da arquitetura do tecido, bem como diferenças significativas entre os grupos. Assim, a DIO parece não exercer nenhum efeito detectável na mucosa intestinal nos moldes do atual estudo, visto que, em todos os grupos que receberam a dieta houve preservação da arquitetura do tecido e ausência de infiltrado inflamatório na lâmina própria e submucosa, assemelhando-se com o observado nos grupos controle (CT, *L. gasseri* e *L. rhamnosus*) (figura 10B e C). Esse resultado corrobora com os dados obtidos no teste de permeabilidade intestinal (figura 10A), em que não foram

observadas diferenças significativas entre os grupos. Isso pode ser explicado, pois a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau, e o grau dessa inflamação não seria o suficiente para causar um dano acentuado na mucosa intestinal que fosse evidenciado nas análises histológicas e na medição da atividade da MPO.

Figura 10 – Avaliação da permeabilidade intestinal por meio da medição da radioatividade no sangue após administração oral de DTPA marcado com tecnécio **(A)** e dos parâmetros inflamatórios no íleo **(B)** e jejuno **(C)** através da medição da atividade de MPO. Os animais foram alimentados com dieta controle (AIN-93) ou DIO durante 8 semanas. Animais receberam 0,1mL de salina 0,9% ou de probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL diariamente durante todo o experimento. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



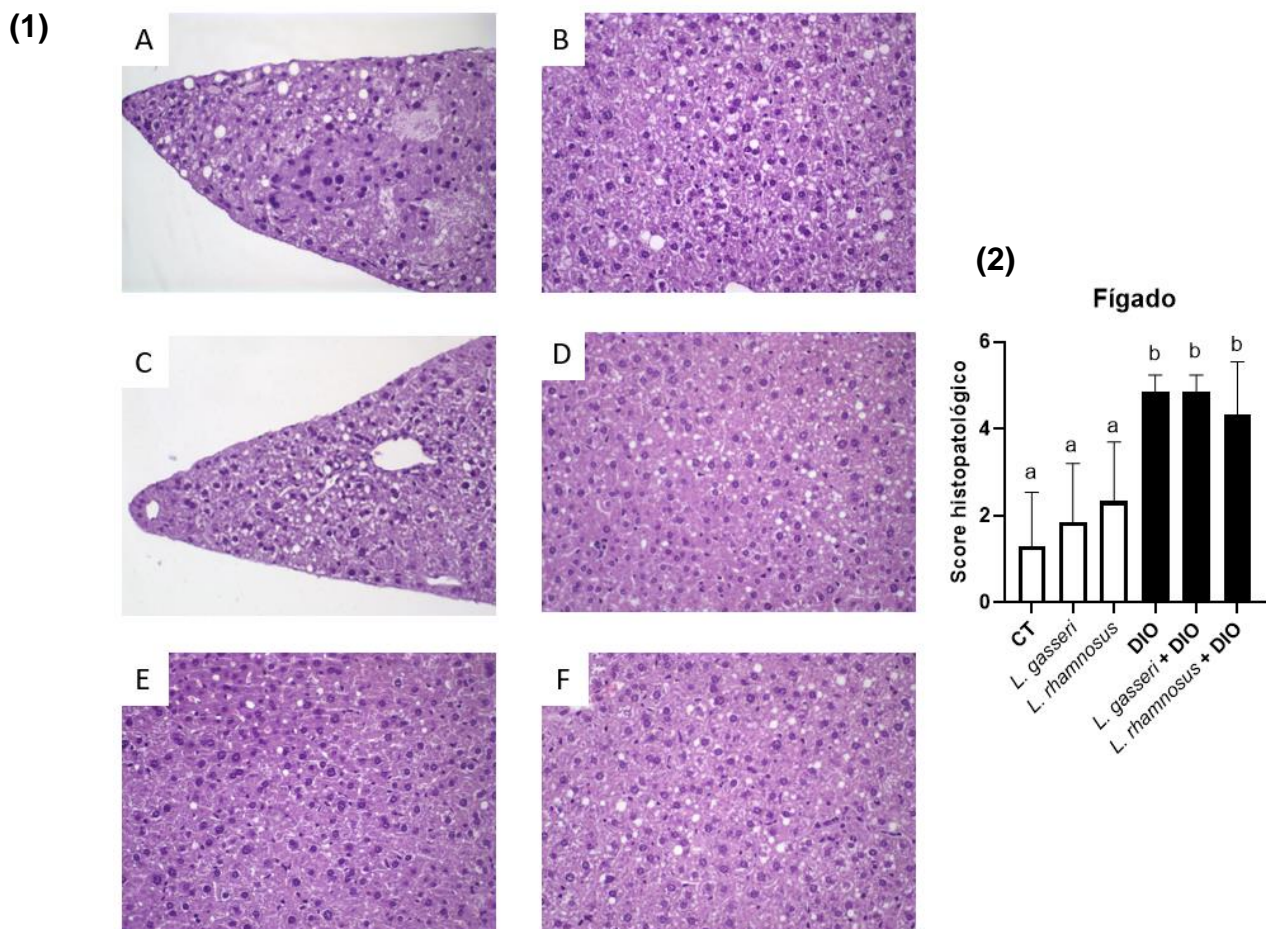
- Fonte: Elaborado pelo autor

5.7 Avaliação histológica e de parâmetros inflamatórios no fígado frente ao consumo da dieta indutora de obesidade

Já com relação ao fígado, o consumo da dieta hiperlipídica aumentou o acúmulo de gordura no órgão de forma significativa quando comparado aos grupos

que receberam a dieta controle (figura 11). A suplementação da dieta com os potenciais probióticos não foi capaz de diminuir o grau de esteatose no tecido quando comparados ao grupo DIO. Entretanto, o tratamento com o probiótico foi capaz de diminuir os parâmetros inflamatórios nesse órgão.

Figura 11 – Corte histológico do fígado (1) e score histopatológico (2). Animais foram submetidos à dieta controle (AIN-93) ou dieta hiperlipídica por oito semanas e receberam 0,1mL de salina 0,9% ou probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL. Após a eutanásia, o tecido foi retirado e fixado em formol tamponado 10%. As lâminas histológicas foram coradas em HE. Aumento 40x. Grupos: (A) Controle; (B) DIO; (C) *L. gasseri*; (D) *L. gasseri* + DIO; (E) *L. rhamnosus*; (F) *L. rhamnosus* + DIO.

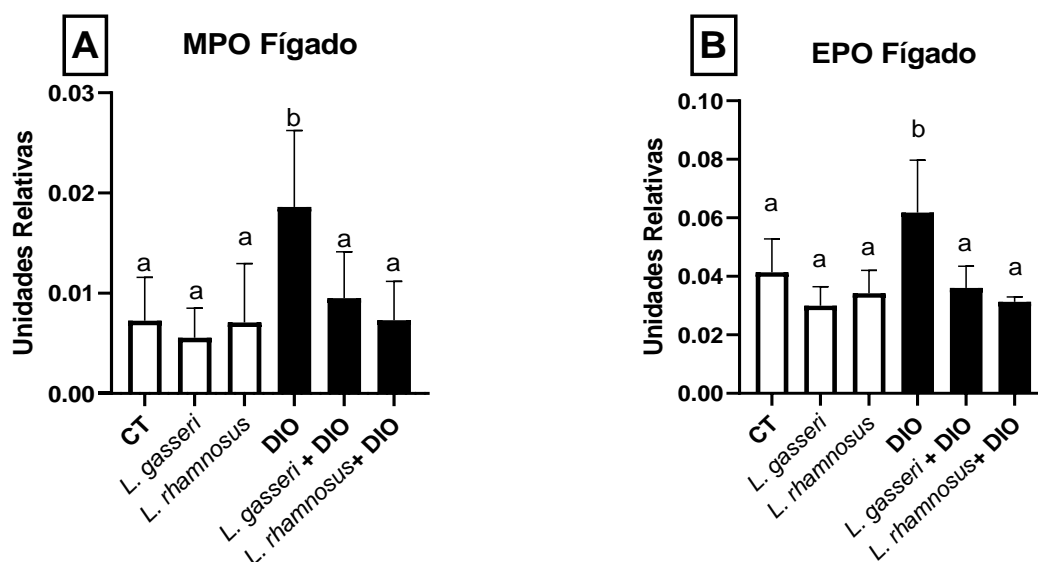


Fonte: Elaborado pelo autor

Dados da literatura mostram que o consumo da dieta hiperlipídica aumenta a resposta inflamatória no organismo (Aguilar *et al.*, 2023; Menta *et al.*, 2022; Rensen *et al.*, 2012), o que corrobora com nossos dados em que o grupo DIO apresentou maior influxo de neutrófilos e eosinófilos para o fígado. Como comentado anteriormente, a atividade de MPO se relaciona com a migração de neutrófilos, já a migração de eosinófilos é inferida através da medição da atividade da peroxidase

eosinofílica (EPO). Observamos que a atividade dessas enzimas estava mais acentuada, de forma significativa, no grupo DIO em relação ao grupo CT ($p < 0,05$) (figura 12). Também, ao comparar o grupo DIO aos grupos que receberam os probióticos e a dieta hiperlipídica, foi observado diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$), indicando que a administração diária de probiótico diminuiu os níveis dessas enzimas no tecido, caracterizando na diminuição da migração de neutrófilos e eosinófilos para o fígado resultando em um menor grau de inflamação tecidual. A infiltração de neutrófilos no tecido adiposo branco caracteriza um dos eventos iniciais para o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, prova disso é que camundongos deficientes em MPO não desenvolvem resistência à insulina nem obesidade, indicando um papel regulador dessa enzima no desenvolvimento da doença (Qaddoumi *et al.*, 2020). Um dos marcos principais da obesidade é a inflamação crônica no fígado; dessa forma, a diminuição dos parâmetros inflamatórios nesse órgão devido à administração dos probióticos pode ter contribuído para o efeito benéfico observado em nosso modelo.

Figura 12 – Avaliação dos parâmetros inflamatórios no fígado por meio da medição da atividade de **(A)** MPO e **(B)** EPO. Os animais foram alimentados com dieta controle (AIN-93) ou DIO durante 8 semanas. Animais receberam 0,1 mL de salina 0,9% ou de probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL diariamente durante todo o experimento. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

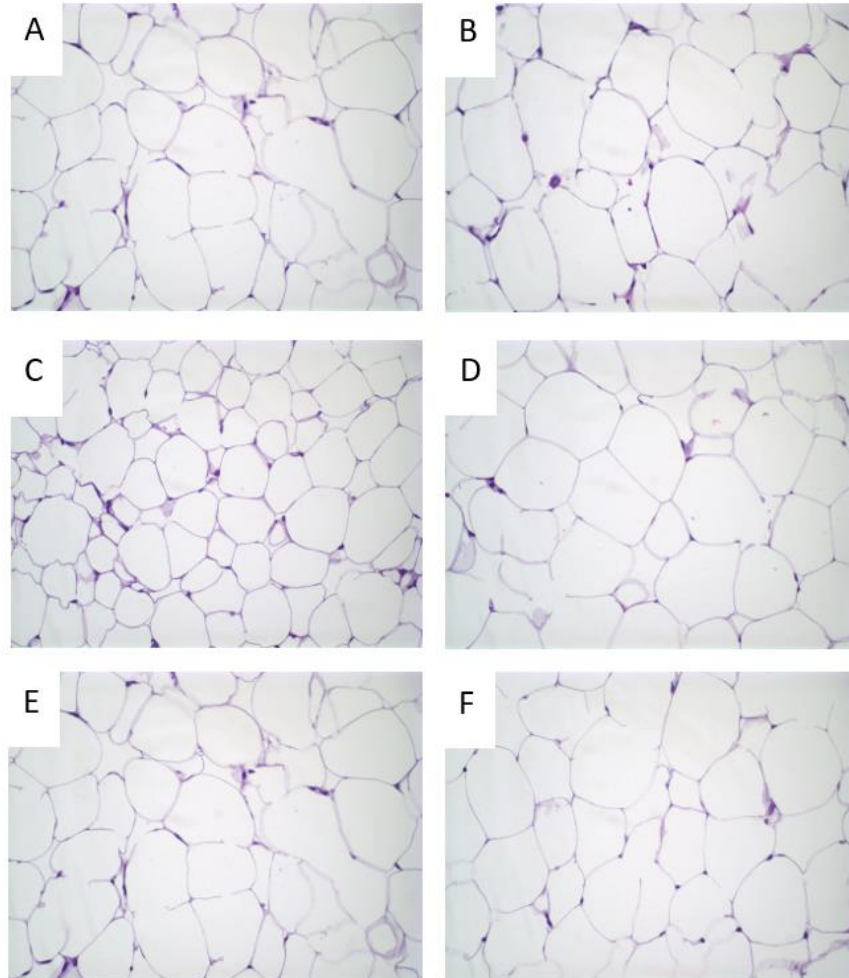


Fonte: Elaborado pelo autor

5.8 Avaliação histológica do tecido adiposo e produção de adipocinas

Com relação ao tecido adiposo epididimal utilizado nas análises histológicas, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O tamanho dos adipócitos e a quantidade de adipócitos por campo foram similares em todos os grupos. Quando o organismo é submetido a uma dieta hiperlipídica por um determinado período, o tecido adiposo pode responder de duas formas para armazenar o excesso de energia ingerido: via hipertrofia dos adipócitos, caracterizado pelo aumento celular acarretando no acúmulo de grande quantidade de gordura dentro da célula, ou via hiperplasia do tecido, onde há o aumento do número de adipócitos (Abuhattum *et al.*, 2022). A dieta e a genética do animal afetam a contribuição desses dois mecanismos no crescimento do tecido adiposo na obesidade (Jo *et al.*, 2009). A hiperplasia é aumentada pela dieta hiperlipídica de uma maneira linhagem-dependente, sugerindo uma interação sinérgica entre genética e dieta; além disso, a dieta rica em gordura aumenta a taxa do aumento celular do adipócito independente da linhagem, sendo influenciada, principalmente, pelo aumento da necessidade do organismo em armazenar energia (Jo *et al.*, 2009). Apesar de não termos observado diferença no tamanho dos adipócitos nos cortes histológicos entre os grupos (figura 13), era notória a diferença entre o volume do tecido adiposo dos grupos controle e os grupos alimentados com a dieta rica em gordura no momento da eutanásia (dados não apresentados). Isso sugere que o tecido adiposo dos animais alimentados com a DIO no momento da coleta do tecido tinha sofrido hiperplasia ocasionando a expansão do tecido. A hipertrofia do tecido adiposo está associada ao aumento da inflamação tecidual, fibrose, hipóxia e deficiência metabólica; já o crescimento hiperplásico não provoca essas mudanças patológicas e, geralmente, é mais favorável metabolicamente (Sakers *et al.*, 2022). Isso pode explicar, pelo menos em parte, os dados obtidos sobre os parâmetros inflamatórios analisados no tecido adiposo em nosso trabalho. Além disso, o tecido adiposo epididimal é considerado tecido adiposo visceral que pode responder de forma diferente do tecido adiposo subcutâneo. Assim, o ganho de peso evidenciado pelo aumento do IMC pode ter ocorrido em outros sítios de tecido adiposo subcutâneo ou mesmo visceral (como o omental e mesentérico).

Figura 13 – Corte histológico do tecido adiposo epididimal. Animais foram submetidos à dieta controle (AIN-93) ou dieta hiperlipídica por oito semanas e receberam 0,1mL de salina 0,9% ou probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL. Após a eutanásia, o tecido foi retirado e fixado em formol tamponado 10%. As lâminas histológicas foram coradas em HE. Aumento 40x. Grupos: **(A)** Controle; **(B)** DIO; **(C)** *L. gasseri*; **(D)** *L. gasseri* + DIO; **(E)** *L. rhamnosus*; **(F)** *L. rhamnosus* + DIO.

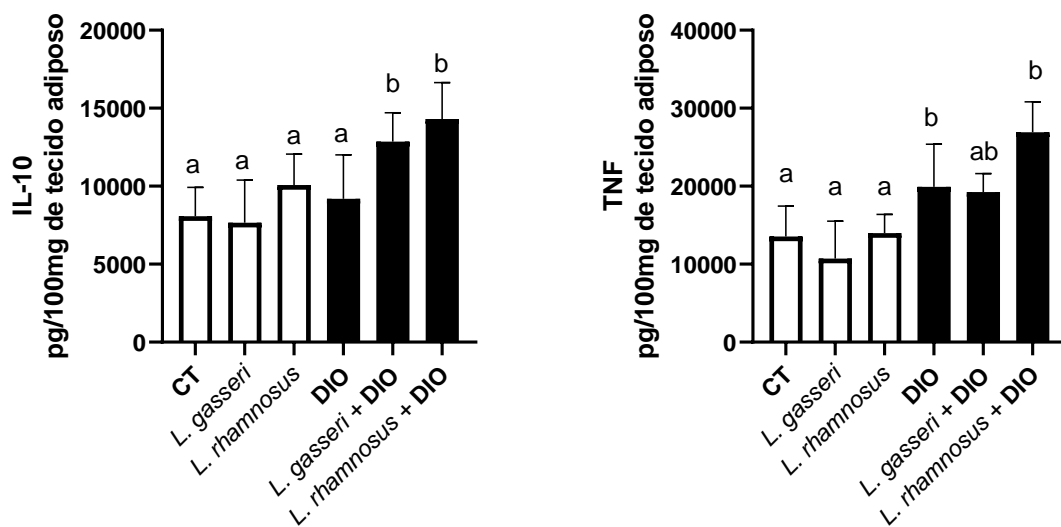


Fonte: Elaborado pelo autor

Como comentado anteriormente, o consumo da dieta hiperlipídica favorece a hipertrofia dos adipócitos e esta, por sua vez, favorece a inflamação do tecido e contribui para o quadro de inflamação crônica de baixo grau característico da obesidade. O *turnover* da hipertrofia do tecido adiposo para hiperplasia, serve como uma forma do organismo de combater a inflamação tecidual e diminuir a produção de marcadores inflamatórios. Com relação a produção de TNF, a DIO induziu o aumento dessa citocina no grupos DIO e *L. rhamnosus* + DIO de forma significativa em relação ao grupo controle (figura 14B). Em contrapartida, houve um aumento na produção de IL10, uma citocina anti-inflamatória, no grupos *L. gasseri* + DIO e *L. rhamnosus* + DIO (figura 14A). Isso pode estar associado ao efeito benéfico observado nesses grupos

em nosso modelo. A IL10 é produzida por macrófagos M2 ativados, células B e células T e age na supressão da polarização de macrófagos M1 e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL1 β e IL6; o aumento dos níveis de IL10 está relacionado à melhora da síndrome metabólica e obesidade em humanos e camundongos por meio da redução do percentual de gordura, melhora na resistência à insulina e diminuição da inflamação do tecido adiposo (Torres *et al.*, 2018). Diversos estudos têm mostrado que a administração de probiótico frente ao consumo de uma dieta hiperlipídica induz o aumento da produção de IL10 trazendo benefícios ao organismo em modelo murino (Castro-Rodríguez *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). Isso demonstra o papel importante que essa citocina pode exercer no organismo e em modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura.

Figura 14 – Quantificação da produção de IL10 (A) e TNF (B) no tecido adiposo através do método de imunofluorescência (ELISA). Os animais foram alimentados com dieta controle (AIN-93) ou DIO durante 8 semanas. Animais receberam 0,1 mL de salina 0,9% ou de probiótico na concentração de 10^9 UFC/mL diariamente durante todo o experimento. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.8 Avaliação comportamental dos animais alimentados com a dieta indutora de obesidade

A dieta hiperlipídica pode impactar negativamente o sistema nervoso central, podendo acarretar em estresse oxidativo, processos neuroinflamatórios, disfunção

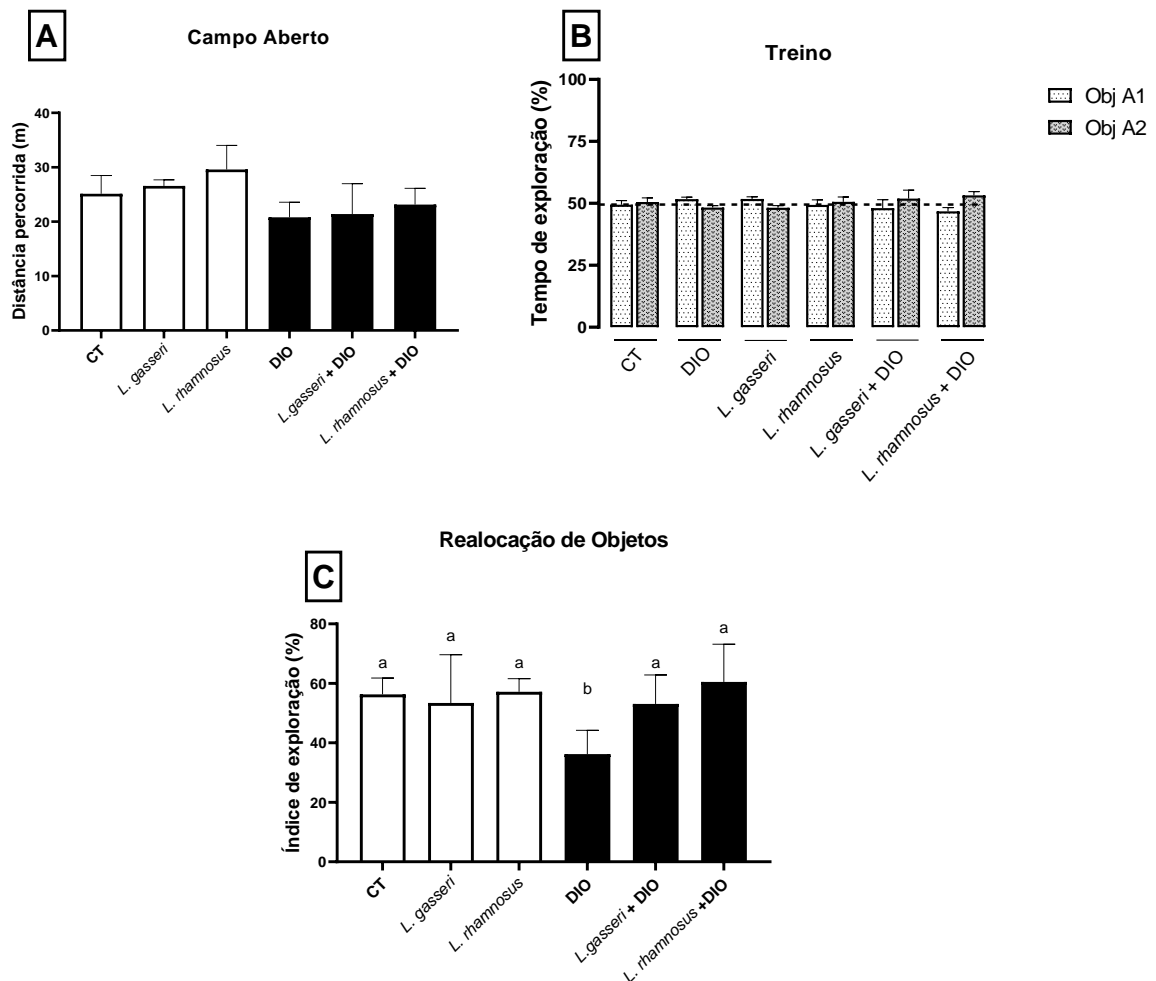
neurovascular, diminuição da neurogênese e perda da integridade dendrítica (Braga *et al.*, 2021). Sendo assim, nosso objetivo aqui foi avaliar se a dieta rica em gordura seria capaz de trazer prejuízos à memória de curta duração dos animais por meio do teste de realocação de objetos. Antes de iniciar o teste, realizamos o teste de campo aberto para analisar se a dieta poderia causar alguma redução na locomoção desses animais que poderia enviesar o teste de realocação de objetos. No teste de campo aberto não observamos diferenças significativas entre os grupos (figura 15A). Esse resultado era esperado, pois indica que a locomoção desses animais não estava comprometida e que o teste de realocação de objetos poderia ser realizado sem viés.

No teste de realocação de objetos, os animais foram expostos a dois objetos localizados dentro de um aparato de acrílico. A primeira parte do teste é a etapa de treino. Nela, os animais são colocados dentro do aparato juntamente com os objetos. Após 5 minutos de exploração, os animais foram retirados do aparato e o tempo de interação com os objetos foi contabilizado. Verificamos que os animais exploraram de forma semelhantes os dois objetos, visto que o tempo de exploração com cada objeto foi aproximado (figura 15B). Essa etapa de treino é importante, pois indica que os animais não tiveram preferência por nenhum objeto, o que poderia prejudicar a interpretação dos resultados na hora do teste em si.

A segunda parte é o teste em si. Após 30 minutos da etapa de treino, os animais foram reintroduzidos no aparato, onde um dos objetos estava realocado. Roedores são animais exploratórios, então esperava-se que o tempo de interação com o objeto realocado fosse maior que o tempo de interação com o objeto que permaneceu no mesmo lugar, visto que o objeto realocado seria uma novidade para eles. Em nosso trabalho, observamos que o tempo de exploração do objeto realocado no grupo DIO foi significativamente menor do que no grupo CT ($p < 0,05$) (figura 15C). Diversos estudos demonstram que o consumo de uma dieta rica em gordura pode causar prejuízos à memória do indivíduo (Braga *et al.*, 2021; de Paula *et al.*, 2021; González Olmo *et al.*, 2023). Uma das causas para que isso ocorra, pode estar relacionada às alterações da composição da microbiota intestinal observada nos animais submetidos à DIO. A microbiota intestinal é responsável por desempenhar funções importantes no metabolismo e regulação do organismo, influenciando o estado nutricional e o estilo de vida do hospedeiro; a microbiota também regula a comunicação entre o intestino e o cérebro, por meio do chamado eixo intestino-cérebro, e tem função no desenvolvimento de algumas condições como depressão, obesidade, autismo e

outras doenças (Ma *et al.*, 2023). A microbiota se comunica e causa alterações no sistema nervoso central via produção e secreção de neurotransmissores, como a serotonina, e por meio da produção de aminoácidos e outros metabólitos, como AGCC e folato (Tooley, 2020). Uma vez que há um distúrbio na composição da microbiota, conhecido como disbiose, há um prejuízo na comunicação do eixo intestino-cérebro que compromete o sistema nervoso central do hospedeiro. Dessa forma, sabendo que a dieta hiperlipídica afeta a composição da microbiota intestinal e que existe um relação entre a composição da microbiota intestinal e comportamento cognitivo dos animais, era esperado que no grupo DIO houvesse uma perda da cognição em relação ao grupo controle. Interessantemente, o tratamento com as bactérias potencialmente probióticas protegeram o sistema nervoso central dos animais melhorando a memória destes de forma significativa quando comparados ao grupo DIO ($p < 0,05$). Em estudos demonstrando a relação entre microbiota e cognição, a suplementação da dieta com probióticos surge como uma terapia adjuvante trazendo benefícios para a função cognitiva, e isso se deve, principalmente, à capacidade desses micro-organismos benéficos em reduzir biomarcadores inflamatórios e oxidativos (Cai *et al.*, 2023). Os lactobacilos pertencem ao grupo das BAL, justamente por produzirem como produto final do seu metabolismo o ácido láctico. Um estudo demonstrou que o tratamento com uma combinação de probióticos contendo linhagens de *Lactobacillus* foi capaz de melhorar o aprendizado e a memória em ratos de meia idade e que isso estaria associado ao aumento dos níveis de lactato no cérebro, que exerceu uma ação anti-inflamatória no local (Webberley *et al.*, 2023). Alterações no ambiente intestinal também podem induzir um prejuízo cognitivo por meio da comunicação do eixo intestino-cérebro que se dá via metabólitos ou fatores imunes produzidos pela microbiota; a suplementação com linhagens de lactobacilos aumenta a concentração de GABA (ácido gama-aminobutírico) no intestino delgado (Cai *et al.*, 2023). Assim, hipotetizamos que o tratamento com *L. gasseri* e *L. rhamnosus* possa ter diminuído a neuroinflamação, via aumento dos níveis de lactato, e revertido o quadro de disbiose causado pelo consumo da dieta hiperlipídica, que pode ter melhorado a comunicação entre o intestino e cérebro pela produção de neurotransmissores e outros metabólitos, como por exemplo GABA.

Figura 15 – Avaliação da memória de curta duração em animais alimentado com a DIO e tratados com *L. gasseri* ou *L. rhamnosus*. **(A)** Teste de campo aberto. Animais foram colocados em um aparato de acrílico, um por vez, por 10 minutos para reconhecimento espacial e avaliação da sua capacidade de locomoção. **(B)** Treino. No dia seguinte, os animais, um por vez, foram colocados no aparato de acrílico juntamente com dois objetos e permaneceram lá por 5 minutos para reconhecimento dos objetos em questão. Após 30 minutos eles foram reintroduzidos no aparato para início do teste. **(C)** Teste de realocação de objetos. Os animais foram reintroduzidos no aparato onde um objeto permaneceu no mesmo lugar e outro foi realocado. O tempo de interação com o objeto realocado foi contabilizado. A análise estatística do teste foi realizada através de One-way ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



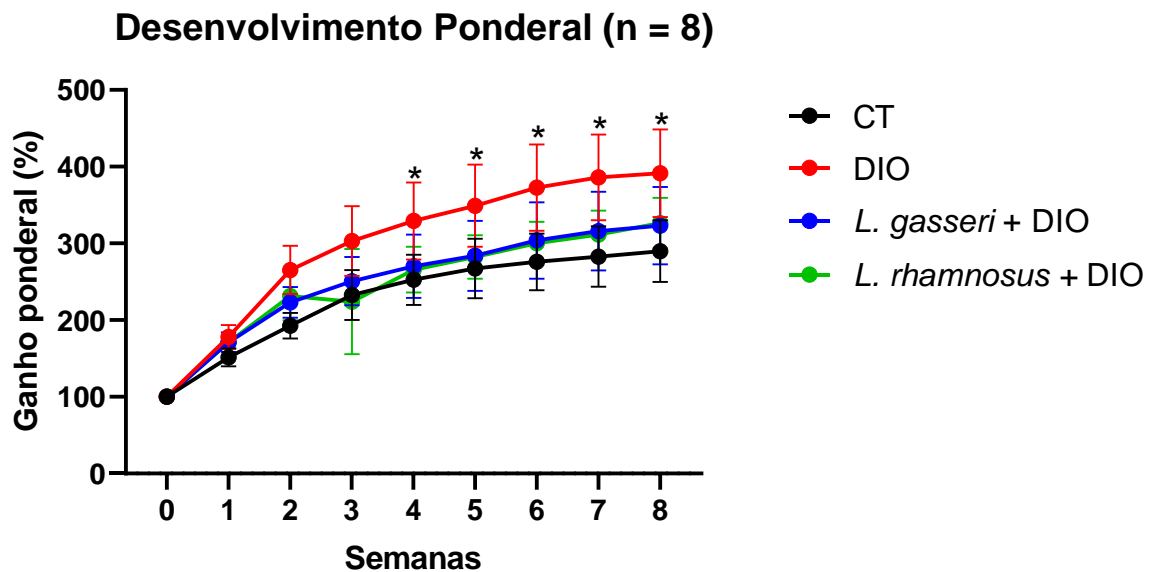
haFonte: Elaborado pelo autor

5.9 A amamentação pode ser um agente protetor na prevenção do ganho de peso da prole

Após avaliar o efeito da administração dos potenciais probióticos em modelo murino de obesidade, nós levantamos a hipótese de que essas bactérias poderiam ser transmitidas para a prole durante a amamentação, prevenindo o ganho de peso nesta. Para isso as mães receberam *L. gasseri* ou *L. rhamnosus* diariamente durante

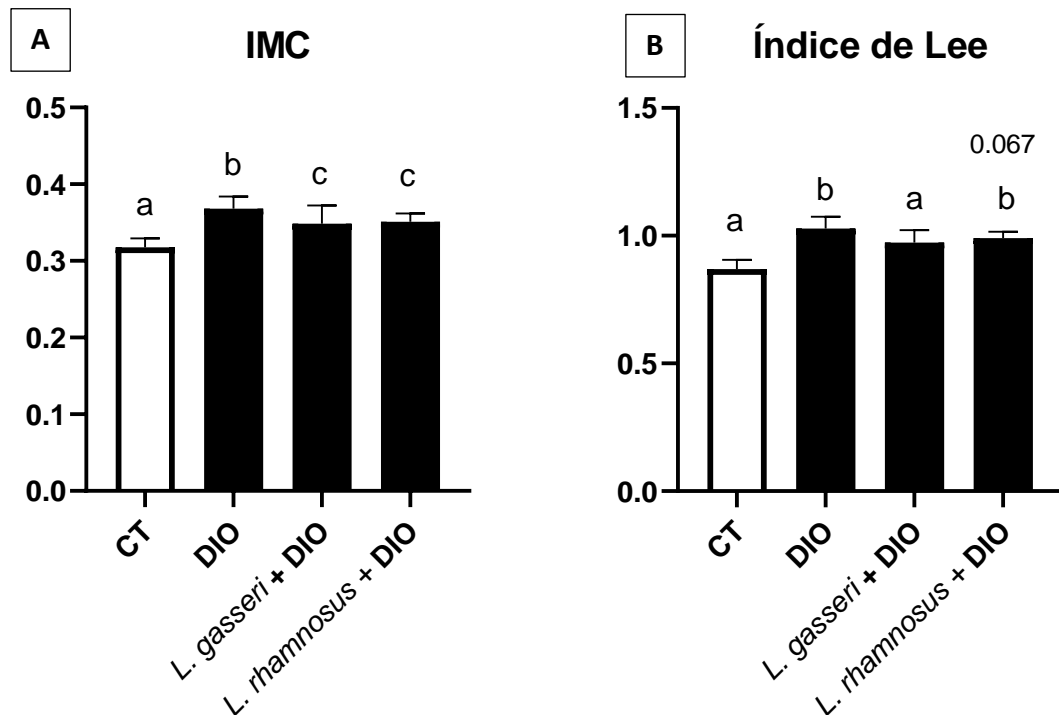
toda a gestação e o período de amamentação. Após o desmame, os filhotes machos foram separados e foi feita a indução da obesidade com a dieta hiperlipídica durante 8 semanas. Os filhotes cujas mães receberam os potenciais probióticos durante a gestação e amamentação ganharam menos peso quando comparados com o grupo cujas mães não receberam nenhum tratamento (grupo DIO) e foram alimentados com a dieta indutora de obesidade de forma significativa ($p < 0,05$) (figura 16). Não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo controle. Com relação ao índice de Lee e IMC, a DIO aumentou de forma significativa esses parâmetros na prole (figura 17A e B) ($p < 0,05$). A administração dos probióticos nas mães diminuiu esses parâmetros na prole após a indução da obesidade em comparação ao grupo DIO.

Figura 16 – Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole. Os animais foram alimentados com a dieta controle (AIN-93M) (grupo CT) ou dieta indutora de obesidade (DIO) (grupo DIO, *L. gasseri* + DIO e *L. rhamnosus* + DIO). Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * indica diferença significativa entre o grupo DIO e demais grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

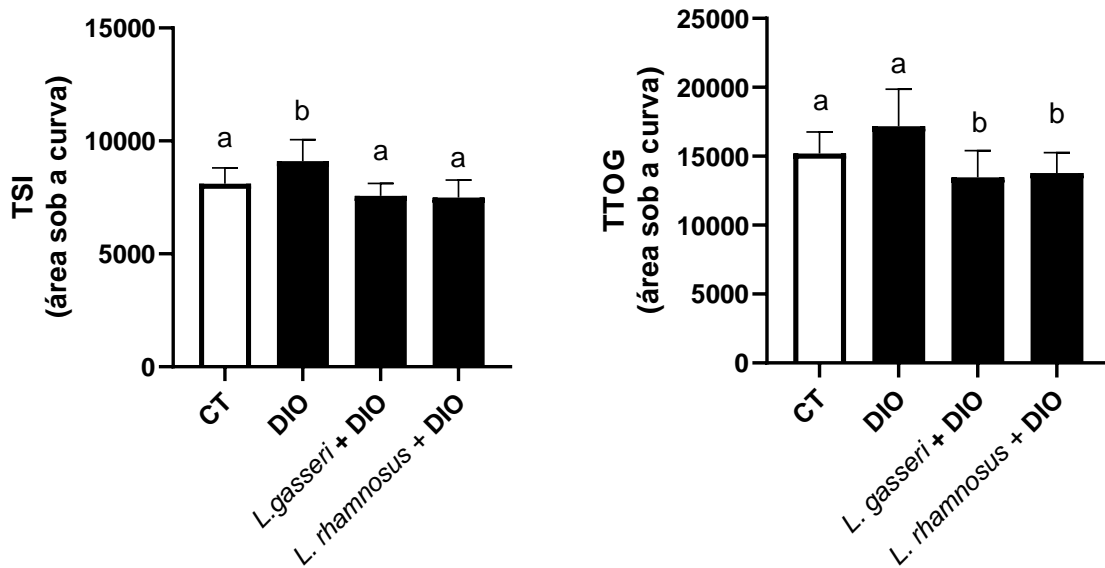
Figura 17 – Análise do índice de massa corporal (IMC) **(A)** e índice de Lee **(B)** para determinação de evolução da obesidade. Os animais foram alimentados com a dieta controle (AIN-93M) ou dieta indutora de obesidade (DIO). One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os benefícios da amamentação são inúmeros, tanto para a mãe quanto para a prole. Diversos estudos demonstraram a relação positiva entre a amamentação e a redução da obesidade em crianças e adolescentes (Liu *et al.*, 2022; Von Kries *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2014). Já para as mães, a amamentação melhorou a tolerância à glicose por meio de mudanças na resposta pancreática mediada por células β em camundongos (Vicente *et al.*, 2020) e melhorou a resistência à insulina e a tolerância a glicose em mulheres japonesas (Yasuhi *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, observamos que a amamentação melhorou a tolerância oral a glicose e a sensibilidade à insulina nos grupos em que foram administrados os probióticos (figura 18A e B) ($p < 0,05$).

Figura 18 – Avaliação da área sob a curva para os testes de sensibilidade à insulina (TSI) **(A)** e de tolerância oral à glicose (TTOG) **(B)**. A análise foi feita via medição da glicose através de uma gota de sangue caudal nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos para o TSI e nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos para o TTOG. A área sob a curva foi calculada para cada animal e os valores obtidos foram utilizados para a construção do gráfico. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

O consumo de uma dieta hiperlipídica por camundongos durante a gravidez e a lactação contribuem para o aumento da adiposidade, resistência à insulina, aumento dos níveis de colesterol e glicose em jejum e desenvolvimento de inflamação hepática na prole (Saengnipanthkul *et al.*, 2021). Isso indica que hábitos maternos durante a gravidez e a lactação podem refletir na saúde da prole. Nesse estudo, portanto, hipotetizamos que a administração de probióticos durante a gravidez poderia trazer benefícios à saúde da prole quando esta fosse desafiada com a dieta indutora de obesidade. Nossos resultados mostram que o perfil lipídico dos camundongos provenientes das mães que receberam os potenciais probióticos foi melhorado de forma significativa para os níveis de colesterol total, HDL e não-HDL ($p < 0,05$) (figura 19A-C). Não houve diferença entre os níveis de triglicerídeos entre os grupos (figura 19D). Com relação aos parâmetros inflamatórios do fígado, não houve diferença no influxo de eosinófilos para o órgão; porém, a atividade da MPO estava diminuída de forma significativa nos grupos cujas mães receberam os potenciais probióticos durante a gestação e lactação (figura 20A e B). Isso pode ter contribuído para a diminuição da adiposidade observada nesse grupo, uma vez que a inflamação crônica do fígado contribui para o desenvolvimento da obesidade.

Figura 19 – Avaliação dos níveis séricos de colesterol total **(A)**, colesterol HDL **(B)**, colesterol não-HDL **(C)** e triglicerídeos **(D)**. Os animais foram alimentados com a dieta controle (AIN-93M) ou dieta indutora de obesidade (DIO). One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

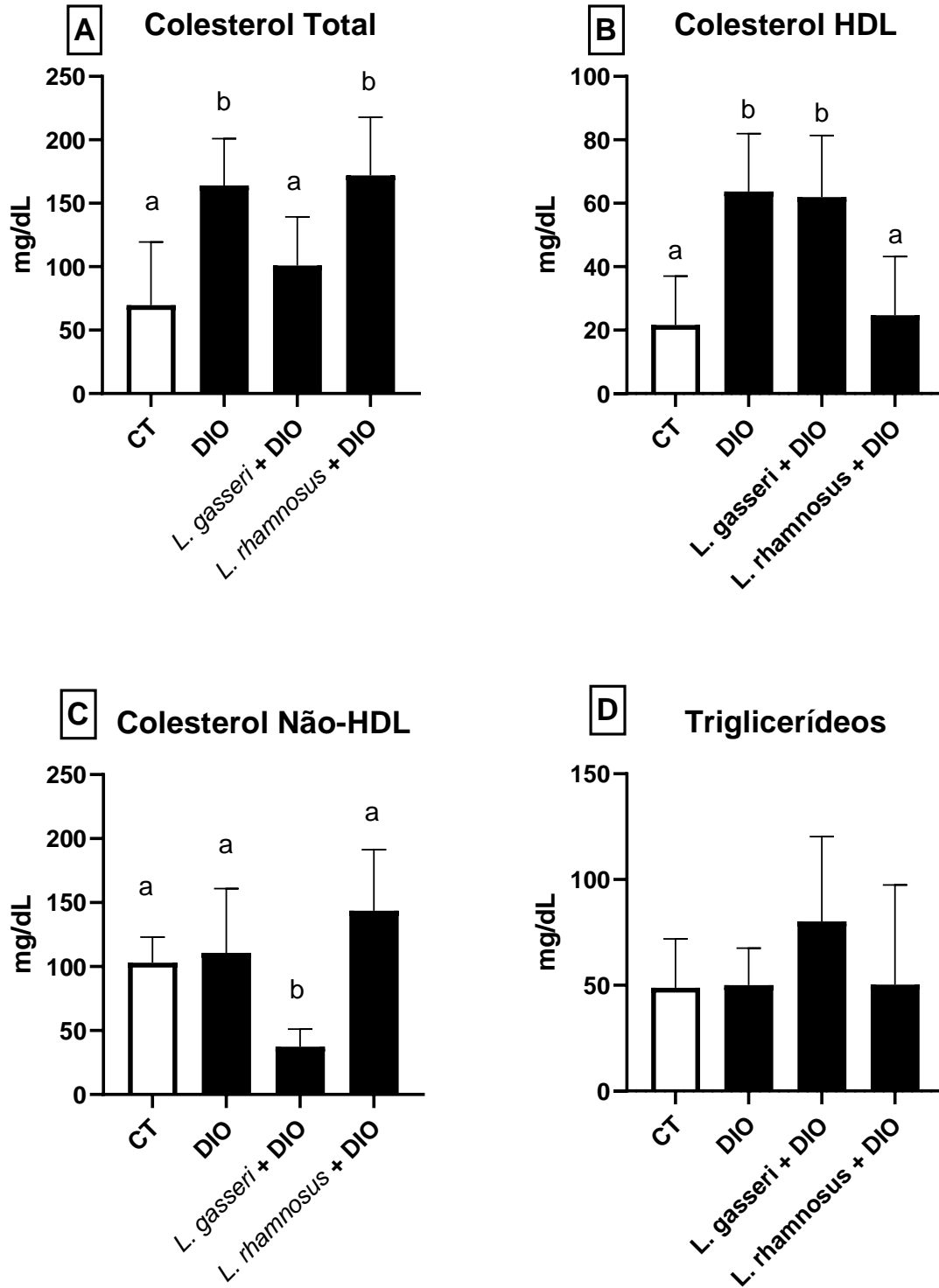
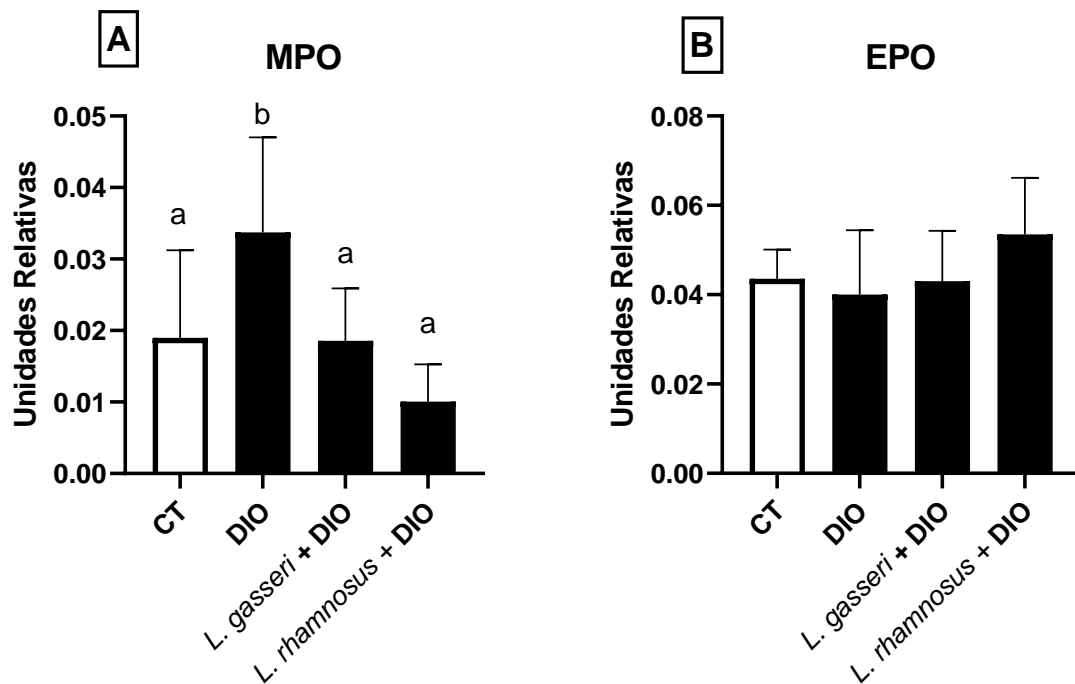


Figura 20 – Avaliação do influxo de neutrófilos e eosinófilos para o fígado através da medição da atividade de MPO (A) e EPO (B), respectivamente. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Uma vez que os animais foram mantidos sob as mesmas condições e receberam a mesma dieta, o único fator diferencial foi a administração de *L. rhamnosus* e *L. gasseri* para as mães durante a gestação e a amamentação. Logo, é possível afirmar que o efeito protetor foi transmitido verticalmente para a prole. Entretanto, a forma como esse efeito foi transmitido para a prole ainda precisa ser estudado. Acreditamos que esse efeito esteja relacionado a presença dessas bactérias no leite materno e que a amamentação tenha sido capaz de prevenir o ganho de massa corporal e melhorar parâmetros metabólicos e inflamatórios na prole.

6 PERSPECTIVAS

Para concluir os objetivos desse trabalho, algumas análises precisarão ser feitas após a conclusão do doutorado. Primeiro, teremos que comprovar a forma como o efeito protetor das bactérias é transmitido das mães para a prole. Nossa hipótese é de que esse efeito é passado verticalmente através da amamentação. Para testar nossa hipótese, iremos marcar geneticamente as bactérias criando um primer específico para elas. Faremos então a coleta do leite materno das mães que receberam as bactérias probióticas e utilizaremos primer para verificar se essas bactérias estão presentes no leite. Caso a presença delas seja confirmada, podemos afirmar que o efeito protetor observado na prole está associado à amamentação.

Em seguida, queremos avaliar por qual motivo essas bactérias conferem uma proteção em modelo de obesidade. Para isso, realizaremos a análise de probiogênomica para verificar se alguma via no genoma dessas bactérias pode explicar o efeito observado em nosso trabalho. Além disso, realizaremos as análises de metagenômica para ter uma informação mais sucinta e robusta sobre o efeito da DIO sobre a microbiota intestinal e como a administração dos probióticos foi benéfica nesse sentido. Tanto o genoma das bactérias quanto os dados da metagenômica já foram sequenciados, porém não tivemos tempo hábil para analisar e acrescentar na tese.

Por fim, realizaremos dosagens de citocinas por qPCR no tecido cerebral, para corroborar os achados obtidos no teste de comportamento, tecido adiposo e fígado. Com a finalização desses experimentos, acreditamos que conseguiremos responder as principais hipóteses do trabalho e publicar nossos resultados em uma revista científica.

7 CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

Esse estudo demonstrou um efeito benéfico da suplementação da dieta com potenciais probióticos isolados do leite materno em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. A administração diária de 0,1 mL das bactérias *L. gasseri* e *L. rhamnosus* na concentração de 10^9 UFC/mL foi capaz de melhorar significativamente alguns importantes parâmetros relacionados à obesidade nos animais. A administração conjunta das duas bactérias, no entanto, não protegeu os

animais em nosso modelo, indicando que nem sempre a associação de um ou mais probióticos é benéfica. Nos animais em que as bactérias foram administradas separadamente, houve uma redução no ganho de peso, melhora na sensibilidade à insulina, aumento da tolerância à glicose, diminuição dos níveis séricos de colesterol total e melhora no quadro de disbiose confirmado pela diminuição da expansão de enterobactérias e aumento na concentração de BAL.

Observamos também uma melhora nos parâmetros inflamatórios, onde o tratamento com as bactérias diminuiu o influxo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o fígado. No tecido adiposo, houve um aumento na produção de IL10, uma citocina anti-inflamatória, e isso pode ter influenciado, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da administração dos probióticos em nosso modelo e redução da adiposidade. Sabendo que a dieta hiperlipídica pode causar neuroinflamação e prejuízos à cognição, realizamos um teste para avaliar a memória dos animais e observamos que a administração de *L. gasseri* e *L. rhamnosus* melhorou a memória de curta duração dos animais e que isso poderia estar associado à resolução da disbiose, melhorando a comunicação do eixo intestino-cérebro, causada inicialmente pelo consumo da dieta rica em gordura.

Por se tratar de bactérias que foram isoladas do leite materno, nosso próximo passo foi avaliar se essas bactérias poderiam ser transmitidas para a prole via amamentação e exercer o mesmo efeito benéfico. Nossos resultados demonstraram que a amamentação exerceu um efeito protetor sobre a prole em modelo de obesidade. Observamos a prevenção do ganho de peso, melhora nos perfis lipídico e glicêmico e diminuição da inflamação no fígado.

Dessa forma, o leite materno humano se mostrou uma importante fonte para a busca de novos agentes bioterapêuticos com resultados significativos em modelo de obesidade, sendo estes uma promissora terapia adjuvante no tratamento da doença.

8 REFERÊNCIAS

- ABUHATTUM, Shada *et al.* Adipose cells and tissues soften with lipid accumulation while in diabetes adipose tissue stiffens. **Scientific Reports** 2022 12:1, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–17, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-13324-9>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- AGUILAR, Edenil Costa *et al.* Dietary gluten worsens hepatic steatosis by increasing inflammation and oxidative stress in ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet. **Food & Function**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 3332–3347, 2023. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/fo/d3fo00149k>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- AN, Hyang Mi *et al.* Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 10, 2011.
- ANTONIOLLI, Luciana Pavan *et al.* Accuracy of insulin resistance indices for metabolic syndrome: A cross-sectional study in adults. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-018-0365-y>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- ARORA, Tulika *et al.* Microbial regulation of the L cell transcriptome. **Scientific Reports** 2018 8:1, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18079-2>. Acesso em: 30 nov. 2022.
- ASSINI, Fabrício Luiz; DUZZIONI, Marcelo; TAKAHASHI, Reinaldo Naoto. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 204, n. 1, p. 206–211, 2009.
- BAGAROLLI, Renata A *et al.* Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 50, p. 16–25, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.006>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- BALAKUMAR, Mahalingam *et al.* Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J

- mice. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 279–295, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-016-1317-7>. Acesso em: 29 nov. 2022.
- BALLARD, Olivia; MORROW, Ardythe L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric clinics of North America**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 49, 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3586783/>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- BLISS, Edward S.; WHITESIDE, Eliza. **The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2018.
- BOQUIEN, Clair Yves. Human milk: An ideal food for nutrition of preterm newborn. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 6, p. 295, 2018.
- BRAGA, Sara Pereira *et al.* Switching from high-fat feeding (HFD) to regular diet improves metabolic and behavioral impairments in middle-aged female mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 398, p. 112969, 2021.
- CABRERA-RUBIO, Raul *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 544–551, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/96/3/544/4576808>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- CAI, Yichen *et al.* Probiotics therapy show significant improvement in obesity and neurobehavioral disorders symptoms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1178399, 2023.
- CANI, Patrice D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 1761–1772, 2007.
- CANO, Paola Gauffin *et al.* Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. **Obesity**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 2310–2321, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/oby.20330>. Acesso em: 4 fev. 2020.
- CAO, G. T. *et al.* Bacillus licheniformis, a potential probiotic, inhibits obesity by modulating colonic microflora in C57BL/6J mice model. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 880–888, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14352>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- CARVALHO, Rodrigo D.De Oliveira *et al.* **Use of wild type or recombinant lactic**

- acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis.** [S. I.]: Frontiers Media S.A., 2017.
- CASTRO-RODRÍGUEZ, Diana C. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SD23 Prevents Metabolic Dysfunction Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity in Male Mice. **Probiotics and antimicrobial proteins**, [s. I.], v. 12, n. 2, p. 505–516, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31129870/>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- CHEN, Yung Tsung *et al.* A combination of *Lactobacillus Mali* APS1 and dieting improved the efficacy of obesity treatment via manipulating gut microbiome in mice. **Scientific Reports**, [s. I.], v. 8, n. 1, 2018.
- CHO, Young Ae; KIM, Jeongseon. Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Medicine**, [s. I.], v. 94, n. 43, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4985374/>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- CHONG, Clara Yieh Lin; BLOOMFIELD, Frank H.; O’SULLIVAN, Justin M. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. **Nutrients 2018, Vol. 10, Page 274**, [s. I.], v. 10, n. 3, p. 274, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/3/274/htm>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- COVASA, Mihai *et al.* Intestinal sensing by gut microbiota: Targeting gut peptides. **Frontiers in Endocrinology**, [s. I.], v. 10, n. FEB, 2019.
- DAMACENO, Quésia S. *et al.* Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. I.], v. 9, n. 4, p. 371–379, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-017-9270-1>. Acesso em: 5 dez. 2020.
- DAMACENO, Quésia S. *et al.* Isolation and Identification of Potential Probiotic Bacteria from Human Milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. I.], 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34671923/>. Acesso em: 16 nov. 2022.
- DE JESUS, Luís Cláudio Lima *et al.* Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. **Journal of Functional Foods**, [s. I.], v. 53, p. 197–207, 2019.
- DE PAULA, Gabriela Cristina *et al.* Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and

- Neuroinflammation as Triggering Events. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2021. Disponível em: /pmc/articles/PMC8600238/. Acesso em: 25 fev. 2024.
- FERNÁNDEZ, Leónides *et al.* The Microbiota of the Human Mammary Ecosystem. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 689, 2020.
- FETISSOV, Sergueï O. **Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2017.
- GEORGIEVA, Marieta; GEORGIEV, Kaloyan; DOBROMIROV, Peter. Probiotics and Immunity. *In*: IMMUNOPATHOLOGY AND IMMUNOMODULATION. [S. l.]: InTech, 2015.
- GOFFREDO, Martina *et al.* Role of gut microbiota and short chain fatty acids in modulating energy harvest and fat partitioning in youth. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 101, n. 11, p. 4367–4376, 2016.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, 2017.
- GONZÁLEZ OLMO, Brigitte M. *et al.* Short-term high-fat diet consumption impairs synaptic plasticity in the aged hippocampus via IL-1 signaling. **npj Science of Food** **2023** **7:1**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41538-023-00211-4>. Acesso em: 25 fev. 2024.
- HASAN, Nihal; YANG, Hongyi. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **PeerJ**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2019. Disponível em: /pmc/articles/PMC6699480/. Acesso em: 1 dez. 2022.
- HILL, Colin *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** **2014** **11:8**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 30 nov. 2022.
- HIME, Neil J. The Role of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) in HDL Metabolism. **The HDL Handbook: Biological Functions and Clinical Implications**, [s. l.], p. 17–33, 2010.
- ICHIM, Thomas E; PATEL, Amit N; SHAFER, Kim A. Experimental support for the effects of a probiotic/digestive enzyme supplement on serum cholesterol

- concentrations and the intestinal microbiome. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 14, p. 184, 2016.
- ISGANAITIS, Elvira *et al.* Maternal obesity and the human milk metabolome: associations with infant body composition and postnatal weight gain. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 111, 2019. Disponível em: /pmc/articles/PMC6599743/. Acesso em: 16 nov. 2022.
- JENSEN-URSTAD, Anne P.L.; SEMENKOVICH, Clay F. **Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger?**. [S. l.: s. n.], 2012.
- JI, Yosep *et al.* Amelioration of obesity-related biomarkers by *Lactobacillus sakei* CJLS03 in a high-fat diet-induced obese murine model. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.
- JIA, Yan Fei *et al.* Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. **BMC Urology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0360-5>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- JO, Junghyo *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1000324, 2009. Disponível em: /pmc/articles/PMC2653640/. Acesso em: 28 fev. 2024.
- JORJÃO, ADELINA LACERDA. METODOLOGIA DA CRIAÇÃO DE *Galleria mellonella* PARA USO COMO MODELO DE INFECÇÃO E EFEITOS DE *Lactobacillus rhamnosus* INATIVADO PELO CALOR in vivo e in vitro , DESAFIADOS POR *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*. **Tese de Doutorado, Instituto de Ciência e Tecnologia**, [s. l.], p. 95, 2016.
- JUMPERTZ, Reiner *et al.* Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 58–65, 2011.
- KALLUS, Samuel J.; BRANDT, Lawrence J. **The intestinal microbiota and obesity**. [S. l.: s. n.], 2012.
- KHALESI, Saman *et al.* **A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype?**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.
- KHANNA, Sakshi *et al.* Administration of indigenous probiotics modulate high-fat diet-induced metabolic syndrome in Sprague Dawley rats. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular**

- Microbiology**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 1345–1359, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-020-01445-y>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- KHANNA, Deepesh *et al.* Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. [s. l.], 2022.
- KIM, Joon Young *et al.* Adipose Tissue Insulin Resistance in Youth on the Spectrum From Normal Weight to Obese and From Normal Glucose Tolerance to Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 265–272, 2019. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/42/2/265/30459/Adipose-Tissue-Insulin-Resistance-in-Youth-on-the>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- KIM, Hye In *et al.* IL-10 Expression-Inducing Gut Bacteria Alleviate High-Fat Diet-Induced Obesity and Hyperlipidemia in Mice. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 599, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC9728323/>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- KOLEVA, Petya T.; BRIDGMAN, Sarah L.; KOZYRSKYJ, Anita L. **The infant gut microbiome: Evidence for obesity risk and dietary intervention**. [S. l.]: MDPI AG, 2015.
- KUMAR, Himanshu *et al.* Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. OCT, p. 1619, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5061857/>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- LANGELLA, Philippe; GUARNER, Francisco; MARTÍN, Rebeca. **Editorial: Next-generation probiotics: From commensal bacteria to novel drugs and food supplements**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01973/full>. Acesso em: 3 fev. 2020.
- LAU, Amy Sie-Yik; XIAO, Jin-Zhong; LIONG, Min-Tze. Bifidobacterium for Infants: Essence and Efficacy. [s. l.], p. 39–72, 2015. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-23213-3_3. Acesso em: 7 mar. 2024.
- LEY, Ruth E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.
- LI, Huizhen *et al.* Probiotic Mixture of Lactobacillus plantarum Strains Improves Lipid

- Metabolism and Gut Microbiota Structure in High Fat Diet-Fed Mice. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 512, 2020.
- LIEW, Winnie Pui Pui *et al.* The binding efficiency and interaction of *Lactobacillus casei* Shirota toward aflatoxin B1. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JUL, p. 382803, 2018. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 7 mar. 2024.
- LIM, Su Min *et al.* *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 337–348, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27001279/>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- LIU, Fange *et al.* Breastfeeding and overweight/obesity among children and adolescents: a cross-sectional study. **BMC Pediatrics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–8, 2022. Disponível em: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-022-03394-z>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- LIU, Wenjun *et al.* Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 4013–4025, 2020.
- LUO, Guangwen *et al.* Major traditional probiotics: Comparative genomic analyses and roles in gut microbiome of eight cohorts. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 712, 2019.
- MA, Ling-chao *et al.* Impact of the microbiome on human, animal, and environmental health from a One Health perspective. **Science in One Health**, [s. l.], v. 2, p. 100037, 2023.
- MALIK, Vasanti S.; WILLETT, Walter C.; HU, Frank B. **Global obesity: Trends, risk factors and policy implications**. [S. l.: s. n.], 2013.
- MANTZIARI, Anastasia; RAUTAVA, Samuli. Factors influencing the microbial composition of human milk. **Seminars in Perinatology**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 151507, 2021.
- MARQUES, Camila Guazzelli *et al.* **Weight loss probiotic supplementation effect in overweight and obesity subjects: A review**. [S. l.]: Churchill Livingstone, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987812/>. Acesso em: 5 abr. 2021.

- MARTINS, Flaviano S. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of medical microbiology**, [s. l.], v. 56, n. Pt 3, p. 352–359, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17314366/>. Acesso em: 7 mar. 2024
- MCKEE, Turney J. *et al.* Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.
- MENTA, Penélope Lacrísio Reis *et al.* Interesterified palm oil increases intestinal permeability, promotes bacterial translocation, alters inflammatory parameters and tight-junction protein genic expression in Swiss mice. **Food Research International**, [s. l.], v. 151, p. 110897, 2022.
- MISHRA, Sanjukta; ACHARYA, Swastik. A Brief Overview on Probiotics: The Health friendly Microbes. **Biomedical and Pharmacology Journal**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1869–1880, 2021.
- MOOSSAVI, Shirin *et al.* Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 324-335.e4, 2019. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1931312819300496/fulltext>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- MUSCOGIURI, Giovanna *et al.* Gut microbiota: a new path to treat obesity. **International Journal of Obesity Supplements**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 10–19, 2019.
- NEWELL, Astrid *et al.* Addressing the obesity epidemic: a genomics perspective. **Preventing chronic disease**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. A31, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362622>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- NOTARBARTOLO, Veronica *et al.* Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 194, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9110848/>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- O'CALLAGHAN, Amy; VAN SINDEREN, Douwe. **Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2016.
- PALMISANO, Brian T. *et al.* Low-density lipoprotein receptor is required for cholesteryl ester transfer protein to regulate triglyceride metabolism in both male and female mice. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2021. Disponível em:

/pmc/articles/PMC7903989/. Acesso em: 8 mar. 2024.

- PNS. **Portal da Secretaria de Atenção Primária a Saúde**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/ape/promocaoaude/excesso>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12600700/>. Acesso em: 25 fev. 2024.
- QADDOUMI, Mohammad G. *et al.* Investigating the Role of Myeloperoxidase and Angiopoietin-like Protein 6 in Obesity and Diabetes. **Scientific Reports 2020 10:1**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-63149-7>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- RENSEN, Sander S. *et al.* Neutrophil-Derived Myeloperoxidase Aggravates Non-Alcoholic Steatohepatitis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2012.
- ROUXINOL-DIAS, Ana Lúcia *et al.* **Probiotics for the control of obesity - Its effect on weight change**. [S. l.]: Elsevier Espana S.L., 2016.
- RUAN, Yuting *et al.* Effect of Probiotics on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4498615/>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- SAENGNIPANTHKUL, Suchaorn *et al.* Maternal exposure to high-fat diet during pregnancy and lactation predisposes normal weight offspring mice to develop hepatic inflammation and insulin resistance. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e14811, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.14811>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- SAKAGUCHI, Kazuhiko *et al.* Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. **Diabetology international**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 53, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC6214468/>. Acesso em: 29 nov. 2022.
- SAKERS, Alexander *et al.* Adipose-tissue plasticity in health and disease. **Cell**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 419–446, 2022.

- SANDERS, Francis W.B.; GRIFFIN, Julian L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 452–468, 2016.
- SANZ, Yolanda; SANTACRUZ, Arlette; GAUFFIN, Paola. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *In:* , 2010. **Proceedings of the Nutrition Society**. [S. l.]: Proc Nutr Soc, 2010. p. 434–441. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20540826/>. Acesso em: 5 abr. 2021.
- SATO, Masao *et al.* Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114507839006>. Acesso em: 4 fev. 2020.
- SELMA-ROYO, Marta *et al.* Human milk microbiome: From actual knowledge to future perspective. **Seminars in Perinatology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 151450, 2021.
- SLOVER, Christine M. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 23–27, 2008.
- SOWERS, James R. Obesity as a cardiovascular risk factor. **American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 115, n. 8 SUPPL. 1, p. 37–41, 2003.
- STATOVCI, Donjete *et al.* **The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2017.
- TIWARI, Aditi; BALASUNDARAM, Palanikumar. **Public Health Considerations Regarding Obesity**. [S. l.]: StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572122/>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- TOOLEY, Katie Louise. Effects of the Human Gut Microbiota on Cognitive Performance, Brain Structure and Function: A Narrative Review. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–17, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7601389/>. Acesso em: 26 fev. 2024.
- TORRES, Sebastian *et al.* Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. **European Journal of Nutrition** 2018 58:1, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 27–43, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-018-1790-2>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- TURNBAUGH, Peter J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.
- VEIGA, P. *et al.* *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces

- inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 42, p. 18132–18137, 2010. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011737107>.
- VICENTE, Julia Modesto *et al.* Long-term increase of insulin secretion in mice subjected to pregnancy and lactation. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 299, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7159261/>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- VIEIRA, Angélica T. *et al.* Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 175, n. 6, p. 2382, 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2789636/>. Acesso em: 8 mar. 2024.
- VINDEROLA, Gabriel *et al.* Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 2, 2011. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00070/abstract>. Acesso em: 3 fev. 2020.
- VON KRIES, Rüdiger *et al.* Breast feeding and obesity: cross sectional study. **BMJ : British Medical Journal**, [s. l.], v. 319, n. 7203, p. 147, 1999. Disponível em: </pmc/articles/PMC28161/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- WANG, Tao *et al.* Anti-obesity effect of Lactobacillus rhamnosus LS-8 and Lactobacillus crustorum MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 2709–2728, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31659451/>. Acesso em: 5 abr. 2021.
- WANG, Tiange *et al.* Association Between Insulin Resistance and Cardiovascular Disease Risk Varies According to Glucose Tolerance Status: A Nationwide Prospective Cohort Study. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1863, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9346991/>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- WANG, Miao *et al.* Intervention of five strains of Lactobacillus on obesity in mice induced by high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 72, p. 104078, 2020.
- WANG, Jingjing *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME Journal** 2015 9:1, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–15, 2014. Disponível em:

- <https://www.nature.com/articles/ismej201499>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- WANG, Xiaoli *et al.* Probiotics alleviate adipose inflammation in high-fat diet-induced obesity by restoring adipose invariant natural killer T cells. **Nutrition**, [s. l.], v. 89, p. 111285, 2021.
- WANG, Zhi Bin *et al.* **The Potential Role of Probiotics in Controlling Overweight/Obesity and Associated Metabolic Parameters in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis**. [S. l.]: Hindawi Limited, 2019.
- WEBBERLEY, Thomas S. *et al.* Assessment of Lab4P Probiotic Effects on Cognition in 3xTg-AD Alzheimer's Disease Model Mice and the SH-SY5Y Neuronal Cell Line. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 4683, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4683/htm>. Acesso em: 27 fev. 2024.
- WELLEN, Kathryn E; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation, stress, and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 115, 2005. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- WHO | OVERWEIGHT AND OBESITY. **WHO**, [s. l.], 2018.
- WONG, Joseph C. *et al.* Comparison of obesity and metabolic syndrome prevalence using fat mass index, body mass index and percentage body fat. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7808627/>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- XIAO, J. Z. *et al.* Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. **Journal of dairy science**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 2452–2461, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12906063/>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- YAN, Jing *et al.* The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. **BMC Public Health**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4301835/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- YASUHI, Ichiro *et al.* The effect of high-intensity breastfeeding on postpartum glucose tolerance in women with recent gestational diabetes. **International Breastfeeding Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5513345/>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- YI, Dae Yong; KIM, Su Yeong. Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 9, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8471419/>.

Acesso em: 21 nov. 2022.

ZHANG, Jing *et al.* Relationship between probiotics and obesity: a review of recent research. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, 2022. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/cta/a/3XzHBrYQWWxq65gNdJhpncT/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

ZWICK, Rachel K. *et al.* **Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue**. [S. l.]: Cell Press, 2018.

9 FINANCIAMENTO

- 1- Projeto “**Avaliação microbiológica do leite materno antes e após o início da amamentação e seleção de potenciais probiótico**”. Universal CNPq 01/2016 – Faixa B (até R\$ 60.000,00). Processo 405073/2016-0. R\$ 60.000,00. Coordenador: Prof. Flaviano dos Santos Martins.

- 2- Projeto “**Efeito probiótico de bactérias isoladas do leite materno como estratégia terapêutica em modelo de obesidade**”. 001/2021 - DEMANDA UNIVERSAL FAPEMIG. Processo APQ-00735-21. Valor: R\$ 78.750,00. Coordenador: Prof. Flaviano dos Santos Martins.

10 ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 117/2019**Título do projeto:** Seleção de probióticos isolados do leite materno e colostro com potenciais efeitos na prevenção de obesidade em modelo animal**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Flaviano dos Santos Martins**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Microbiologia**Situação atual:** *Decisão Final - Aprovado*Aprovado na reunião do dia 27/05/2019. Validade: 27/05/2019 à 26/05/2024
Belo Horizonte, 27/05/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br