



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
NÚCLEO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO HUMANA E ANIMAL
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

Priscila Marques Arbex

**Estudo da modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos e
possíveis efeitos sobre o metabolismo de camundongos C57Bl/6**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Peters

**JUIZ DE FORA
MINAS GERAIS – BRASIL**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
NÚCLEO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO HUMANA E ANIMAL
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

Priscila Marques Arbex

Estudo da modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos e possíveis efeitos sobre o metabolismo de camundongos C57Bl/6

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Maria Peters

**JUIZ DE FORA
MINAS GERAIS – BRASIL**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Arbex, Priscila Marques.

Estudo da modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos e possíveis efeitos sobre o metabolismo de camundongos C57Bl/6 / Priscila Marques Arbex. -- 2020.

122 p. : il.

Orientador: Vera Maria Peters

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2020.

1. Dieta hipercalórica. 2. Probióticos. 3. Prole. 4. Gravidez. 5. Camundongos. I. Peters, Vera Maria, orient. II. Título.

Priscila Marques Arbex

Estudo da modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos e possíveis efeitos sobre o metabolismo de camundongos C57Bl/6

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de Concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 26/11/2020


BANCA EXAMINADORA



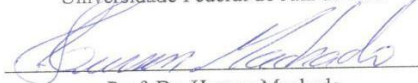
Profª. Dra. Vera Maria Peters - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Marcos Vidal Martins
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª. Dra. Ana Livia de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Hussen Machado
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Profª. Dra. Marcella Martins Terra
Universidade Presidente Antônio Carlos

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado a todos que
tem a coragem de viver
os seus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A finalização do doutorado significa encerrar um ciclo que me foi de incontáveis desafios e grande amadurecimento. Chegar até esse momento só é possível porque, ao longo do caminho estiveram ao meu redor pessoas que me fizeram ver além.

Agradeço a Deus que está sempre comigo sendo a minha fé, força e intuição.

Ao meu pai Fauzi (*in memoriam*), que me ensinou o que há de mais precioso na vida, que é vencer por meio do estudo com amor e dedicação.

A minha mãe Gilca, que não me deixou desistir nos dias difíceis e me apoiou com seu amor incondicionalmente nas minhas decisões.

Ao meu amor Danilo, que fez da minha caminhada final a dele também. Renunciou dias ao meu lado para que eu pudesse viver o sonho de morar em outro país e na distância se fez presente, sendo o meu porto seguro e a minha certeza na vida.

A minha família que sempre me apoiou na realização dos meus sonhos.

A minha amada amiga Karla, que com seu amor me ensinou a ver a vida sobre outro olhar e me transformou. Que sorte a minha ter você.

As minhas amadas amigas há mais de 25 anos, Nati e Elisa, que são minha base de sabedoria, amor e suporte em todos os momentos que me trouxeram até hoje.

A minha amada amiga Araceli, que me mostrou o quanto sou capaz e não me deixou ter menos do que merecia, sempre trazendo luz ao meu caminho.

Aos meus dois xodós nessa vida, Juca e Duk, que me ensinam sobre amor sem dizerem uma palavra.

A prof^a Dr^a Vera Peters que me ensinou sobre a ciência dos animais de laboratório, mas mais do que isso, me ensinou que é no caminho em meio a pesquisa que estão as maiores lições sobre a vida. Obrigada por tanto.

A prof^a Dr^a Martha Guerra que sempre confiou e acreditou no meu trabalho, me dando forças para seguir adiante.

Ao grupo de pesquisa da ETH- ZÜRICH, que me desafiou do primeiro ao último dia em que estive na Suíça, colegas que me ensinaram sobre ser resiliente, paciente

e aberta a novos aprendizados. Em especial ao prof^o Dr. Ferdinand Von Meyenn que me recebeu de forma tão generosa e fez parte da realização de um sonho. Como eu disse a ele “não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim”. Sem dúvidas, foi o período de maior crescimento pessoal e profissional de toda minha vida. *Danke für alles!*

Ao meu casal de amigos Rafa e Oliver que foram minha família e meu suporte na Suíça. Que presente compartilhar tantos momentos com vocês.

Aos meus colegas do CBR que tornaram a minha rotina mais fácil: Marcella Terra, Gabriel Lade, Vinícius Moreira, Leonardo Toshio, Jéssica Ferraz, Daniela Carvalho e Mariana Bolotari. Obrigada por cada dia compartilhado.

A técnica Lorena que fez os meus dias no CBR mais leves com sua amizade, e sempre bons conselhos dentro e fora do trabalho.

A todos os membros do CBR que foram fundamentais para a realização desse projeto, especialmente a Ana Paula Lélis, que dividiu comigo muitos finais de semana com o tratamento dos animais e que é parte responsável pela realização desse trabalho. A estagiária Gabrielle que me auxiliou nas análises e no projeto.

Ao Centro de Biologia da Reprodução que me forneceu a estrutura, os insumos e todo o pessoal técnico qualificado para que esse trabalho fosse o melhor possível.

Aos animais que passaram pelas minhas mãos, ensinando sobre respeito e resiliência. Esse trabalho também é dedicado a eles.

Às redes mineiras TOXIFAR e Bioteirismo pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa do doutorado sanduíche e do Brasil.

A pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora pela colaboração e auxílio na execução desse projeto.

A vocês os meus sinceros agradecimentos.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá.

De alguma maneira você chega lá. ”

Ayrton Senna

RESUMO

A dieta ocidental baseada no aumento de ingestão de gorduras saturadas e carboidratos simples, como a frutose, é uma importante modificação do estilo de vida que fornece aporte hipercalórico aos indivíduos. Associada ao balanço energético positivo e as modificações ocasionadas pela gestação, pode causar obesidade e trazer consequências à saúde intestinal. Além dos impactos negativos na geração parental submetida, a transmissão epigenética pode predispor as gerações descendentes às doenças crônicas como a própria obesidade, doença hepática não alcoólica, doenças cardiovasculares e até desordens comportamentais. No presente estudo, buscou-se avaliar a influência da suplementação de probióticos durante a gestação de camundongos fêmeas que receberam dieta hipercalórica (HC) rica em gordura saturada e carboidratos simples durante a vida adulta, gestação e lactação sobre parâmetros metabólicos nas mães e nas gerações masculinas e femininas F1. A dieta HC promoveu dislipidemia, maior adiposidade, maior coeficiente de eficiência energética, maior área sob a curva para o Teste de Tolerância à Glicose e menor taxa de decaimento da insulina para o Teste de Tolerância à Insulina. Os grupos que receberam dieta HC apresentaram valores de leptina superiores aos seus respectivos controles. O TNF α do grupo que recebeu dieta hipercalórica e suplementação de probióticos apresentou valores superiores aos de seus respectivos controles. Os intestinos mostraram infiltrações inflamatórias leves. O grupo gestante que recebeu dieta HC apresentou lipidose hepática moderada a grave, porém quando suplementado com probiótico, o tecido hepático foi compatível com o do grupo controle, ou seja, sem gotículas de gordura. Os camundongos descendentes das gerações F1, em que as mães foram expostas à dieta hipercalórica apresentaram ganho de peso e alta adiposidade até a idade adulta, embora todos os filhotes fossem alimentados com ração padrão após o desmame. O aumento do peso corporal final, massa de tecido adiposo e glicose descendente do grupo gestante que recebeu dieta HC, indica que a dieta experimental foi capaz de produzir características obesogênicas na prole. De outro modo, o grupo gestante que recebeu dieta hipercalórica quando suplementado com probióticos diminuiu a adiposidade e o peso relativo do fígado na geração F1 tanto em machos quanto em fêmeas. Os machos

também apresentaram aumento nos níveis de colesterol HDL. Ainda são necessários estudos mais profundos, porém tem-se que, como conclusão, o modelo experimental utilizado para a dieta hipercalórica com a suplementação de probióticos alterou parâmetros metabólicos dos animais da geração F0, com efeito nos animais de gerações F1 de camundongos C57Bl/6.

Palavras-chave: dieta hipercalórica, probióticos, prole, gravidez, camundongos.

ABSTRACT

The Western diet based on increased intake of saturated fats and simple carbohydrates, such as fructose, is an important lifestyle change that provides individuals with a high calorie intake. Associated with the positive energy balance and the changes caused by pregnancy, it can cause obesity and have consequences for intestinal health. In addition to the negative impacts on the submitted parental generation, epigenetic transmission can predispose descendants to chronic diseases such as obesity, non-alcoholic liver disease, cardiovascular diseases and even behavioral disorders. In the present study, we sought to evaluate the influence of probiotic supplementation during pregnancy of female mice that received a high-calorie diet (HC) rich in saturated fat and simple carbohydrates during adulthood, pregnancy and lactation on metabolic parameters in mothers and generations male and female F1. The HC diet promoted dyslipidemia, greater adiposity, greater energy efficiency coefficient, greater under the curve for the Glucose Tolerance Test and lower insulin decay rate for the Insulin Tolerance Test. The groups that received the HC diet had leptin values higher than their respective controls. The TNF α of the group that received a high-calorie diet and supplementation of probiotics showed higher values than their respective controls. The intestines showed mild inflammatory infiltrations. The pregnant group that received the HC diet presented moderate to severe liver lipodosis, but when supplemented with probiotic, the liver tissue was compatible with that of the control group, that is, without fat droplets. Mice descended from F1 generations, whose mothers were exposed to the high-calorie diet, showed weight gain and high adiposity until adulthood, although all puppies were fed standard feed after weaning. The increase in final body weight, mass of adipose tissue and glucose descended from the pregnant group that received the HC diet, indicates that the experimental diet was able to produce obesogenic characteristics in the offspring. Otherwise, the pregnant group that received a high-calorie diet when supplemented with probiotics decreased adiposity and the relative weight of the liver in the F1 generation in both males and females. Males also showed an increase in HDL cholesterol levels. Further studies are still needed, but it has to be concluded that the experimental model used for the hypercaloric diet with the supplementation of probiotics changed the metabolic

parameters of animals of the F0 generation, with effect on animals of F1 generations of C57Bl / 6 mice.

Keywords: hypercaloric diet, probiotics, offspring, pregnancy, mice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – enzima ácido graxo carboxilase

ACL – enzima ATP citrato liase

AG – ácido graxo

ALT – alanina aminotransferase

AMPK – proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

AST – aspartato aminotrasferase

C – dieta do tipo padrão para roedores

CBR – Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora

CEE – coeficiente de eficiência energética

CIAEP – Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa

CNA – comprimento nasoanal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

F1 – primeira geração descendente da geração parental

FAS – enzima ácido graxo sintase

FMT - transplante de microbiota fecal

HC – dieta do tipo hipercalórica – Rica em gordura saturada e frutose

HDL – lipoproteína de alta densidade - colesterol HDL

HFD - dieta do tipo hiperlipídica – Rica em gordura saturada

IL-6 – interleucina 6

IMC – índice massa corpórea

IRS – receptores de insulina

JAM – moléculas de adesão juncional

LDL – lipoproteína de baixa densidade – colesterol LDL

LPL – lipase lipoproteica

LPS – lipopolissacarídeo

MAMP – padrão molecular associado a patógeno

PCF – peso corporal final

PCI – peso corporal inicial

PKA – proteína quinase

PPAR- γ – receptor por proliferadores de peroxissoma gama

PRR – receptores de reconhecimento de padrões

RI – resistência insulínica

SOCS3 – proteína supressora da sinalização de citocinas 3

SPF – livres de germes patogênicos específicos

TA – tecido adiposo

TAB – tecido adiposo branco

TAB-SC – tecido adiposo branco subcutâneo

TAM – tecido adiposo marrom

TG – triglicerídeos

TGI – trato gastrointestinal

TJ – ‘tight junctions’

TLR – ‘toll like receptor’

TOTG – teste oral de tolerância à glicose

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TTI – teste de tolerância à insulina

UCP 1 – proteína desacopladora um

ZO – zonulina

SUMÁRIO

1	Introdução	21
2	Revisão de literatura.....	23
2.1	Epidemiologia da obesidade.....	23
2.2	Características morfofuncionais do tecido adiposo	24
2.3	Tecido adiposo e metabolismo	27
2.4	Consumo de frutose	29
2.5	Adipogênese e organogênese	31
2.6	O papel do TNF- α e da leptina.....	33
2.7	Frutose e NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica)	36
2.8	O potencial transgeracional da obesidade	37
2.8.1	Programação do Desenvolvimento e Transmissão Transgeracional da Obesidade	39
2.9	A microbiota intestinal.....	40
2.9.1	A microbiota intestinal na gestação	42
2.9.2	A microbiota vaginal e placentária.....	43
2.10	Microbiota, permeabilidade intestinal e a inter-relação com o consumo alimentar	44
2.11	A disbiose intestinal	47
2.12	Evidências de disbiose intestinal na obesidade	48
2.13	Probióticos	49
2.13.1	Características e propriedades	49
2.13.2	Mecanismos de ação.....	51
2.13.3	Segurança	54
2.13.4	Características do Biorich®	55
2.14	Estratégias terapêuticas na modulação da microbiota intestinal	55
2.14.1	A alimentação como moduladora da microbiota intestinal	56
2	HIPÓTESE.....	58
3	OBJETIVOS	59
3.1	Objetivo geral	59
3.2	Objetivos específicos	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1	Animais	60
4.2	Composição das dietas	60
4.3	Probiótico	61
4.3.1	Teste de viabilidade Bio-rich®.....	62
4.4	Delineamento experimental.....	63
4.4.1	Obtenção da geração F1	64
4.5	Dados biométricos	65
4.6	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	65
4.7	Teste de tolerância à insulina (TTI).....	66
4.8	Determinação do Coeficiente de Eficiência Energética (CEE)	66

4.9	Eutanásia	67
4.10	Análise bioquímica sérica	67
4.11	Histomorfometria e histopatologia.....	67
4.11.1	Tecido hepático e adiposo	67
4.11.2	Intestino	68
4.12	Dosagem de TNF- α e leptina.....	69
4.13	Análise estatística.....	69
5	Resultados e discussão	70
6	Comentários gerais	71
7	Conclusão	72
8	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO 1.....	90
	ANEXO 2.....	91
	APÊNDICE 1	92

1 Introdução

A transição nutricional, por meio da ocidentalização da alimentação, levou ao aumento da disponibilidade de alimentos de elevado teor calórico e ricos em frutose, como refrigerantes e alimentos pré-preparados, como os processados e ultra processados, que contribuem para o aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a obesidade (BRAZ *et al.*, 2019).

A microbiota de cada indivíduo é única, definida por fatores como genética, tipo de parto, amamentação, idade, uso de antibióticos, dieta e ambiente em que vive (LANG; EISEN; ZIVKOVIC, 2014; RAYMOND *et al.*, 2016). Estima-se conter 100 trilhões de microrganismos, número dez vezes maior que a quantidade de células humanas (SHEN; OBIN; ZHAO, 2013). As diferenças na microbiota intestinal entre animais magros e obesos ou seres humanos sugerem uma ligação entre a microbiota intestinal e a homeostase energética, afetando tanto a aquisição de nutrientes quanto a regulação da energia adquirida (TAIRA *et al.*, 2015). Na obesidade, a forma como o organismo metaboliza os nutrientes é um fator essencial para agravar a patologia, de maneira que a composição da microbiota intestinal determina a produção de lipoproteínas lipases e modula a absorção de lipídios (SMITS *et al.*, 2016). Cada população bacteriana pode manipular a absorção de nutrientes de uma forma específica (HOOPER *et al.*, 2001).

Além disso, estudos mostram que a alteração da microbiota tem relação direta com processos inflamatórios ligados à obesidade. A microbiota regula a quantidade de leucócitos presentes no trato gastrointestinal, sendo os neutrófilos e os macrófagos de grande importância na inflamação aguda e crônica (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; EREJUWA; SULAIMAN; AB WAHAB, 2014;).

Evidências recentes apontam que existe uma relação entre dieta, microbiota intestinal, lipopolissacarídeos (LPS) e obesidade. As alterações metabólicas observadas têm sido consideradas um achado para o desenvolvimento de novas opções de tratamento, principalmente no sentido de modular a microbiota intestinal através do consumo de probióticos (RODRIGO *et al.*, 2018; KOLIADA *et al.*, 2017).

Recentemente, mostrou-se a presença de bactérias no ambiente intrauterino. No período pré-natal, a microbiota exerce influência nos sistemas imune e metabólico (WALKER *et al.*, 2017). Após o nascimento, o intestino passa a ser colonizado por bactérias envolvidas na digestão de alimentos, regulação energética, síntese de vitaminas e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteção contra patógenos e na modulação do sistema imune (RAYMOND *et al.*, 2016).

Existe um interesse crescente na compreensão sobre qual a relação entre alterações na composição da microbiota intestinal e a ocorrência de parto prematuro, eclâmpsia, morte fetal intrauterina e alterações metabólicas, como o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e resistência insulínica na infância, e que se estendem até a vida adulta (JORDAN *et al.*, 2017; NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016).

Assim, entre os desafios atuais na área da Nutrição está o de se elucidar como a dieta e os probióticos podem contribuir para a modulação de microbiota intestinal associada à saúde.

2 Revisão de literatura

2.1 Epidemiologia da obesidade

A obesidade é resultado do balanço energético positivo, decorrente da redução na prática de exercício físico e do aumento no consumo de alimentos hipercalóricos, fontes de açúcar e gordura. É uma doença crônica não transmissível e epidêmica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo branco (TAB) (PALHARES *et al.*, 2017; VALLE; DURCE; FERREIRA, 2008).

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade atingem 53,8% e 18,9% da população brasileira, respectivamente (VIGITEL, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1,9 bilhão de adultos com mais de 18 anos apresentavam excesso de peso corporal em 2016. Acima de 650 milhões de adultos foram diagnosticados com obesidade, o equivalente à 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres). A obesidade tornou-se um dos problemas mais importantes de saúde pública, pois é considerada uma das cinco principais causas de morte no mundo, sendo fator de risco para o desenvolvimento de diversas outras doenças como diabetes tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, dislipidemia, nefropatias e câncer (PALHARES *et al.*, 2017).

Paralelamente, os sinais e sintomas da obesidade podem ser agravados conforme o grau de classificação proposto pela OMS: obesidade grau I para Índice de Massa Corporal (IMC) entre 30 e 34,9 kg/m²; obesidade grau II para IMC de 35 a 39,9 kg/m² e obesidade grau III para IMC \geq 40 kg/m². Ainda, a obesidade grave (grau III) resulta em implicações para além dos aspectos físicos, afetando atividades da vida diária, psicoemocionais, sociais e ocupacionais, o que pode ter influência significativa na qualidade de vida (WHITE *et al.*, 2013).

No âmbito da fisiopatologia, o balanço energético positivo crônico decorrente da elevada ingestão energética e reduzida prática de atividade física pode ser destacado como principal fator etiológico. Uma influência importante no balanço energético positivo é o estresse e a ansiedade, associados à ingestão alimentar que, segundo a Diretriz de Obesidade (2017), tal associação é mais frequente em mulheres. Somam-se ainda aos fatores etiológicos da obesidade,

componentes neuroendócrinos, genéticos, dietéticos, culturais, psicossociais, além da composição da microbiota intestinal a qual é uma perspectiva que vem sendo intensamente estudada nos últimos anos (TAUQEER; GOMEZ; STANFORD, 2018).

Sabe-se que é necessário um balanço negativo para proporcionar a redução de gordura corporal, assim, o tratamento clínico com dieta e restrição energética é a principal opção de tratamento. Existem evidências que a orientação de déficit energético de 500 kcal à 1.000 kcal diárias para redução de peso acarreta redução de 0,5 a 1 kg por semana (Diretriz de Obesidade, 2016). Pode-se considerar eficaz uma redução de peso maior ou igual à 1% do peso corporal por mês (ABALOVICH *et al.*, 2016). Além do foco quantitativo e qualitativo de alimentos ingeridos no tratamento dietético, é imprescindível o planejamento de estratégias comportamentais que estimulem a adesão ao tratamento para redução de peso e manutenção do mesmo.

2.2 Características morfofuncionais do tecido adiposo

Essencialmente, todas as espécies animais evoluíram para armazenar energia na forma de triglicerídeos (TG) (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). O tecido adiposo é o principal órgão responsável pelo armazenamento de lipídios, podendo ser diferenciado em tecido adiposo branco (TAB) ou tecido adiposo marrom (TAM). Ambos os depósitos apresentam diferentes características morfológicas, funcionais e moleculares (BÓDIS; RODEN, 2018; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; POUTAHIDIS *et al.*, 2013).

Os adipócitos do TAB contribuem para o reservatório energético no organismo, pois são capazes de armazenar lipídios na forma de TG, o que ocorre em uma única gotícula lipídica, conferindo característica unilocular. Por outro lado, o TAM é multilocular, formado por adipócitos contendo múltiplas pequenas gotículas lipídicas, alto conteúdo de mitocôndrias e é altamente vascularizado e innervado (JEŽEK; JABŮREK; PORTER, 2019; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). Diferente do TAB, o TAM tem como função a manutenção da temperatura corporal devido à alta capacidade que os adipócitos apresentam para dissipar energia na forma de calor. Além disso, a participação do TAM na manutenção

da homeostase energética também foi evidenciada na literatura (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; BÓDIS; RODEN, 2018; RAYMOND *et al.*, 2016).

O local primário de armazenamento de energia varia entre as espécies.

Em humanos e roedores, os adipócitos são organizados em depósitos de TAB anatomicamente distintos, os quais podem ser divididos em depósitos viscerais e subcutâneos (TAB-SC) (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). No entanto, a proporção individual de TAB subcutâneo para TAB visceral varia de acordo com a idade, sexo, nutrição, homeostase energética de depósitos específicos e genética (BÓDIS; RODEN, 2018; SONG; YE *et al.*, 2015). Dependendo das diferenças específicas pelo sexo, o TAB visceral é responsável por 6% a 20% e o TAB-SC por 80% a 90% do tecido adiposo do corpo inteiro (BÓDIS; RODEN, 2018).

O TAB visceral é considerado mais ativo, por apresentar maior sensibilidade à lipólise, e por isso maior liberação de ácidos graxos (AG) e secreção de adipocinas relacionadas a inflamação como a interleucina 6 (IL-6), e resistência à ação da insulina. Já o TAB-SC é responsável pela maior expressão de leptina (BÓDIS; RODEN, 2018; ABESO, 2016).

O papel do TAB é armazenar lipídios na forma de TG através da lipogênese e por disponibilizar AG pela lipólise, gerando substratos para o metabolismo energético, via β -oxidação, em períodos de déficit calórico. A regulação desses processos ocorre através de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (BÓDIS; RODEN, 2018; ZHANG, ZHI YUN *et al.*, 2013).

A lipogênese inicia-se a partir da esterificação do glicerol 3-fosfato com acilCoA, é catalisada pela enzima glicerol 3-fosfato aciltransferase (GPAT) formando 1-acilglicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico), reação que ocorre tanto no retículo endoplasmático quanto na mitocôndria. Posteriormente, o ácido lisofosfatídico é esterificado com outro acilCoA, processo catalisado pela enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) localizada no retículo endoplasmático e que resulta na formação de 1,2-diacilglicerol-3-fosfato (ácido fosfatídico). Foram identificadas oito isoformas de AGPAT, sendo a isoforma 2 a principal encontrada no tecido adiposo (YUE *et al.*, 2019).

O ácido fosfatídico formado é então utilizado na formação de diferentes fosfolipídios ou para síntese do TG. Na síntese de TG, o grupamento fosfato do

carbono 3 do ácido fosfatídico é retirado pela ação da enzima fosfatase de ácido fosfatídico (PAP) formando 1,2-diacilglicerol (BÓDIS; RODEN, 2018). Finalmente, um terceiro acilCoA é adicionado ao diacilglicerol pela ação da diacilglicerol aciltransferase (DGAT 1 e 2) formando os TG (BÓDIS; RODEN, 2018; LEE; SHIN; CHOUE, 2010) (Figura 1).

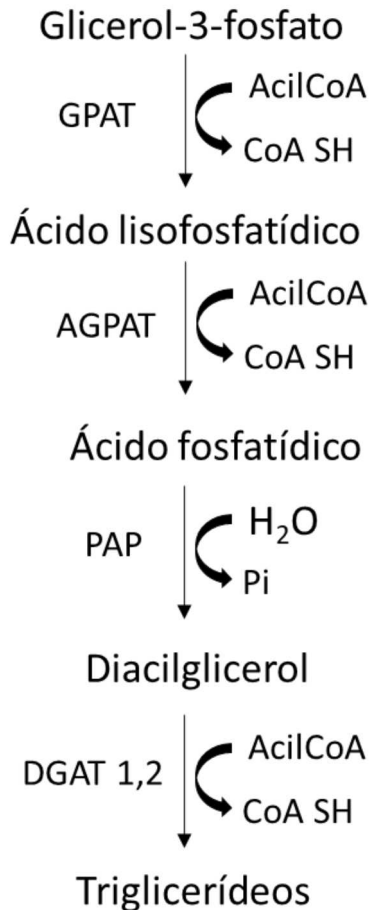


Figura 1 - Biossíntese de triglicerídeos

A lipólise consiste na hidrólise sequencial da molécula de TG, formando subsequentemente diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e três ácidos graxos livres (AG), processos estes catalisados respectivamente pelas enzimas lipase de triglicerídeos do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e lipase de monoglicerídeos (MGL) (BÓDIS; RODEN, 2018(Figura 2).

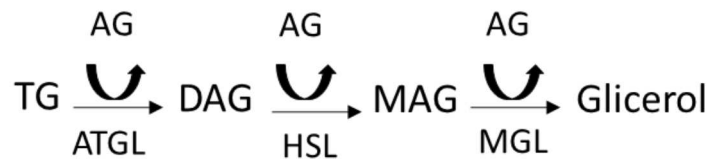


Figura 2 – Hidrolise do triglicerídeo

Já a lipogênese *de novo*, consiste em processos metabólicos a partir de substratos diferentes de lipídeos que resultam na síntese nas gotículas de gordura do adipócito (BÓDIS; RODEN, 2018; SONG; ZIYI; XIAOLI; YANG, 2018). Esse processo ocorre pela conversão da citrato em acetil-CoA pela enzima ATP citrato liase (ACL). A Acetil-CoA formada é convertida a malonil-CoA pela enzima ácido graxo carboxilase (ACC) que será utilizada como substrato para síntese de TG pela enzima ácido graxo sintase (FAS) (BÓDIS; RODEN, 2018; COATE *et al.*, 2013; SONG; ZIYI; XIAOLI; YANG, 2018(Figura 3).

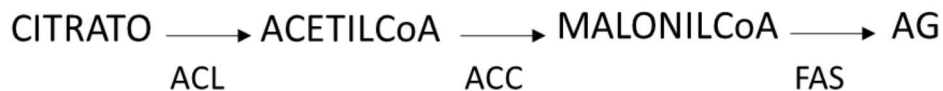


Figura 3 - Lipogênese *de novo*

2.3 Tecido adiposo e metabolismo

Sabe-se que o TAB em excesso contribui para o desenvolvimento da resistência insulínica e DM2, e que o TAM está envolvido na dissipação de energia na forma de calor, reduzindo a deposição de gordura. Nesse sentido, o TAM tem sido um alvo terapêutico para o tratamento de doenças metabólicas (MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017; NG *et al.*, 2014).

A diferenciação do tecido adiposo branco em marrom, termo conhecido como 'browning' tem sido amplamente estudado em função do grande potencial para modular o balanço energético e prevenir doenças metabólicas (CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2019). Nesse contexto, a possibilidade de diferenciar adipócitos com características marrons no TAB, denominados de bege, que aumentam a termogênese e o gasto de energia, pode contribuir no

manejo da obesidade e suas comorbidades associadas (CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2019; CODELLA; LUZI; TERRUZZI, 2018).

A atividade pró-inflamatória das adipocinas e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo caracterizam a obesidade como um estado de inflamação crônica de baixo grau e têm importante relação com o aumento da resistência à insulina, diabetes tipo 2, aterosclerose, bem como demais alterações metabólicas relacionadas à inflamação (MORRISON *et al.*, 2009).

Através da ativação simpática induzida pelo frio, o TAM aumenta a lipólise, a captação de glicose e a biogênese mitocondrial. Além disso, leva à geração de calor, por meio da proteína desacopladora do tipo 1 (UCP-1) (JEŽEK; JABŮREK; PORTER, 2019). A ação da norepinefrina induz à formação do AMPc. Subsequentemente, o AMPc promove a fosforilação de enzimas lipolíticas no citosol. Os AG oriundos da lipólise são oxidados, e as concentrações de H⁺ no meio intermembrana da mitocôndria aumentam por consequência (JEŽEK; JABŮREK; PORTER, 2019). Enquanto o gradiente de prótons da respiração oxidativa leva à síntese de ATP, a ação da UCP-1 nas mitocôndrias do TAM desacopla o gradiente de prótons, aumentando assim a liberação de energia na forma de calor (JEŽEK; JABŮREK; PORTER, 2019; MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017).

Entre as consequências metabólicas da adiposidade está o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). Essas citocinas podem promover resistência insulínica (RI) através da inativação do receptor de insulina via fosforilação do resíduo serina (HIROSUMI *et al.*, 2002), através da indução da supressão da proteína supressora da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) (HOWARD; FLIER, 2006) e ainda, através da produção de espécies reativas de oxigênio (HOUSTIS; ROSEN; LANDER, 2006).

A adiponectina, adipocina secretada de maneira inversa à adiposidade corporal, promove aumento da oxidação de AG no músculo esquelético através da ativação do receptor por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) e da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (JIALAL; DEVARAJ, 2018), aumento da captação de glicose nos adipócitos (MELN *et al.*, 2019), aumento da secreção de insulina e redução da concentração plasmática de glicose (TAIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, observa-se redução na sua

concentração em roedores com doenças metabólicas, como DM2 e obesidade (JIALAL; DEVARAJ, 2018).

2.4 Consumo de frutose

A frutose é considerada um dos carboidratos fermentáveis (*FODMAPS: fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols*) mais importantes. Na dieta humana ocidental, os carboidratos correspondem de 200 a 300g/dia ou a cerca de 40% a 50% da energia ingerida. Em países da América do Norte, a ingestão diária de frutose livre, ou seja, quando se exclui a sacarose, é de cerca de 16g/dia. Se somado ao consumo de xaropes de milho, ricos em frutose, pode atingir 60 a 100g/dia e até 150g/dia se somada a frutose proveniente da sacarose (CLAYTON *et al.*, 2015).

Estima-se no Brasil o consumo médio de cerca de 4,34g/dia de frutose livre, originária de frutas, doces, hortaliças e outros vegetais. A quantidade de frutose provinda da sacarose é de aproximadamente 27,5g/dia. Nos últimos anos observou-se que a dieta da população brasileira vem sendo modificada com tendência para redução do consumo de leguminosas, hortaliças e frutas e ao crescente consumo de salgados industrializados, chocolates, refrigerantes, pizzas e sanduíches prontos, os quais a grande maioria possui xarope de milho nos ingredientes (IBGE, 2011; BARREIROS, 2005).

É um açúcar de baixo custo utilizado na indústria alimentícia em sucos, doces, produtos adoçados e embutidos. Tipicamente consumido como sacarose (açúcar de mesa) ou como componente do xarope de milho rico em frutose (HFCS do inglês High-fructose corn syrup). O HFCS é extensivamente utilizado em refrigerantes, produtos de padaria, geléias, laticínios, biscoitos industrializados e barras de cereais. A facilidade de manuseamento deste adoçante líquido e o seu baixo preço fizeram com que o seu uso aumentasse progressivamente nos últimos 30 anos em comparação com o da sacarose (WILDER-SMITH *et al.*, 2014) coincidindo assim com a incidência crescente da obesidade (CLAYTON *et al.*, 2015). É um carboidrato tipo monossacarídeo, cuja estrutura molecular apresenta-se na forma de hexose que, com a glicose, é constituinte do dissacarídeo sacarose. Também pode ser encontrada em tri e tetrassacarídeos, como a rafinose e a estaquiose, presentes em leguminosas

como soja, lentilha, ervilha e feijão. Os carboidratos presentes nas leguminosas não são completamente digeridos pelo organismo e sofrem fermentação pela ação de bactérias no intestino grosso, com a produção de gases. A frutose está presente em outros polímeros denominados frutanos ou inulina que estão presentes na cebola, chicória, cereais e aspargos (FEDEWA, AMY; RAO, 2015).

Os enterócitos possuem enzimas capazes de clivar os dissacarídeos lactose, sacarose e maltose, entre outros pequenos polímeros de glicose. O dissacarídeo sacarose, por exemplo, divide-se em uma molécula de glicose e outra de frutose. Assim, os produtos finais da digestão de carboidratos são todos monossacarídeos hidrossolúveis que são absorvidos facilmente na corrente sanguínea (TAPPY; LE, 2010). As etapas iniciais do metabolismo não são dependentes de insulina, sendo largamente metabolizada sem exigir a secreção desse hormônio e sem influência significativa na glicemia pós-prandial. Apesar do seu metabolismo hepático primário, sabe-se que parte da frutose parece ser diretamente metabolizada nos enterócitos, onde é convertida em lactato e glicose (PARKS *et al.*, 2008).

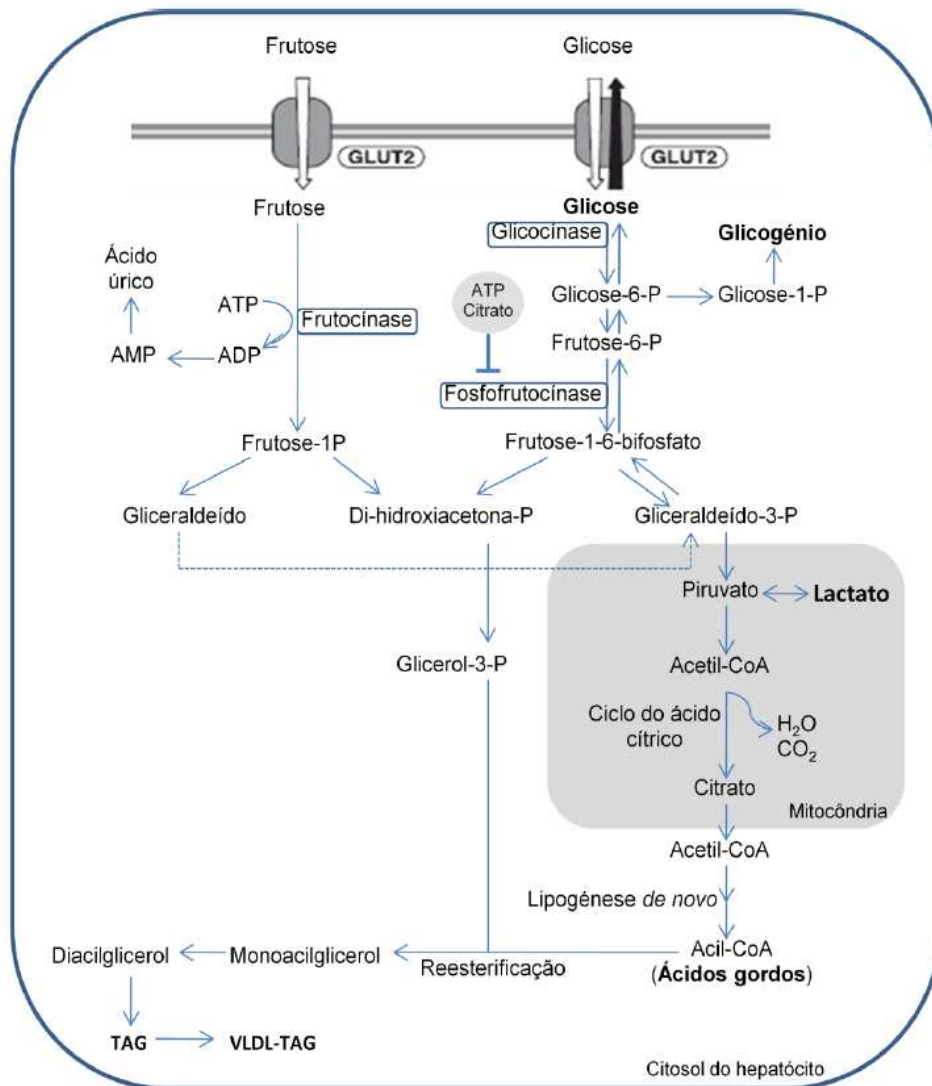


Figura 4 –Metabolismo hepático da frutose.

Fonte: Adaptado de TAPPY *et al.*, (2010).

2.5 Adipogênese e organogênese

Durante o desenvolvimento do tecido adiposo, as células-tronco são sensíveis a sinais pró-adipogênicos (hormônios e metabólitos) (QASIM *et al.*, 2018). Esses sinais induzem uma série de modificações epigenômicas nas regiões abertas do genoma, contendo genes adipogênicos, que precisam estar acessíveis para a transcrição. Os perfis epigenômicos são estabelecidos durante a adipogênese, que ocorre em duas etapas: comprometimento das células-tronco com o destino dos pré-adipócitos e diferenciação terminal.

Nas células-tronco, a transcrição de genes pluripotentes é ativa e os genes adipogênicos são fechados pela presença de marcas epigenéticas repressivas (Metilação do DNA, H3K27me3 e H3K9me3). Durante o comprometimento da linhagem, os genes adipogênicos são pausados pela presença de histonas bivalentes (H3K4me3 e H3K27me3), observado em pré-adipócitos. Durante a diferenciação terminal, o estado bivalente é resolvido para um estado ativo associado ao recrutamento dos primeiros fatores de C / EBPb, receptor de glicocorticoide, SREBP-1c e ZFP423). Esses fatores de transcrição induzem à reorganização da cromatina para regiões abertas do genoma contendo genes envolvidos na segunda onda do fator de transcrição, sendo os mais importantes o Pparg e o Cebpa. Os segundos fatores de transcrição se ligam à cromatina e transcrevem genes adipogênicos (Glut4, Adipoq e Lep) (LECOUTRE *et al.*, 2018; HOLTRUP *et al.*, 2017; LECOUTRE; BRETON, 2015).

A adipogênese ocorre principalmente durante o desenvolvimento, isto é, gestação e lactação. O tecido adiposo é formado não apenas no período embrionário, mas também nas etapas pós-natal até a puberdade. A primeira infância e a puberdade são períodos importantes para o desenvolvimento de massa normal de tecido adiposo. De fato, em humanos e roedores, o número e o tamanho dos adipócitos aumentam gradualmente até puberdade em condições fisiológicas (HOLTRUP *et al.*, 2017).

Após a puberdade, o número e tamanho de adipócitos permanecem estáveis (JIANG, YUWEI *et al.*, 2014). Sob condições normais de dieta, os adipócitos possuem um turn over de 10% ao ano em humanos e 10 a 20% ao mês em roedores. Porém, em ambientes obesogênicos, a expansão do tecido adiposo pode resultar em aumento do tamanho e do número dos adipócitos durante o desenvolvimento e a idade adulta (BERRY; JIANG; GRAFF, 2016). Em roedores, a obesidade materna durante a gestação prejudica o desenvolvimento e termogênese adaptativa do TAB na prole, com diminuição do gasto energético, persistência da adiposidade, resistência à insulina e intolerância à glicose (SONG, YE *et al.*, 2015; TREESUKOSOL *et al.*, 2014).

Presente na adipogênese, o TAB secreta um grande número de fatores peptídicos conhecidos como adipocinas. Várias dessas moléculas, como leptina e IL-6, são aumentados na obesidade e podem desencadear a inflamação crônica de baixo grau que liga obesidade com resistência à insulina (LECOUTRE

et al., 2017). Entre eles, a leptina é um regulador crítico de muitas funções fisiológicas, da saciedade à imunidade (SONG, YE *et al.*, 2015).

Foi relatado que os filhotes de ratos desmamados de mães obesas apresentaram maior adiposidade, hipertrofia adipocitária, hiperleptinemia e expressão elevada do gene da leptina em TAM (LECOUTRE; BRETON, 2015). A lactação é caracterizada por atividade epigenômica ativa e remodelação das sequências reguladoras da leptina (isto é, maior hidroximetilação do DNA e modificações de histonas H3K4me1 / H3K27ac) em depósitos subcutâneos e viscerais com aumento dos níveis de expressão de RNAm de Lep. No entanto, na idade adulta, a regulação positiva da Lep via epigenética persiste apenas no TAB visceral (LECOUTRE *et al.*, 2017), o que pode refletir diferenças na programação.

Nos ratos, uma dieta HFD durante a gravidez e lactação também leva à metilação de H4K20 no promotor de Lep na prole, e esse efeito se torna mais forte se a dieta materna continua por várias gerações (MASUYAMA *et al.*, 2015). Em um modelo de roedores multigeracional, mostrou-se que a dieta hipercalórica causou um 'ciclo de alimentação' exacerbando os processos pró-inflamatórios do TA via hipometilação do DNA em genes de reconhecimento de padrões inatos, como Tlr1 e Tlr2 (DING *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que modificações na dieta materna pode reprogramar o TAB da prole por meio de mecanismos epigenéticos, que podem afetar a saúde metabólica futura.

2.6 O papel do TNF- α e da leptina

Há mais de 20 anos se sabe que o tecido adiposo expressa o TNF- α . Todas as células desse tecido são capazes de produzir citocinas, porém os adipócitos são as principais secretoras e expressam ambos os receptores que medeiam a transdução de sinal desencadeada por essa citocina, o TNFR I e II. Os genes que codificam esta citocina são expressos diferentemente no tecido adiposo subcutâneo e visceral (FJELDBORG *et al.*, 2014).

O TNF- α é uma citocina multifuncional, implicada em inflamação, apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas como IL-1 e IL-6, e indução de resistência à insulina. Com relação aos adipócitos, age diretamente

em processos dependentes de insulina, incluindo a homeostase do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise, tendo papel como importante regulador no acúmulo de gordura no tecido adiposo (FJELDBORG *et al.*, 2014).

Inicialmente, pensava-se que a razão para o aumento séricos desta citocina em obesos fosse a superprodução pelo tecido adiposo. Entretanto, atualmente tem sido reconhecido que esse aumento é devido à infiltração de macrófagos M1 no TAB (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014). Independente do agente responsável pelo aumento de TNF- α , inúmeros achados demonstram que níveis elevados desta citocina estão relacionados com a resistência à insulina e, conseqüentemente, com a etiologia do DM2 (FJELDBORG *et al.*, 2014; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; VOLP *et al.*, 2008).

O TNF- α parece ter papel importante na fisiopatologia da resistência à insulina através da diminuição da expressão à superfície celular dos transportadores de glicose (GLUT-4), fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e fosforilação específica do receptor da insulina (SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

A produção de TNF- α por células imunes pode ser estimulada também por níveis aumentados de leptina. Essa citocina aparece em níveis elevados em modelos animais de obesidade comparados aos controles magros, sendo um importante intermediário entre inflamação e obesidade. Ele reduz a sensibilidade à insulina, contribuindo para a resistência ao hormônio (FJELDBORG *et al.*, 2014; SHIBATA *et al.*, 2012).

Há ainda indícios de que o aumento da expressão gênica de TNF- α no tecido adiposo bem como a sua elevada concentração plasmática poderiam induzir à obesidade, em parte, por alterar a liberação na circulação de outras adipocinas, como o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e a adiponectina. Ratificam essa hipótese resultados de experimentos envolvendo ratos tratados com tiazolidinedionas. Foi verificada diminuição da expressão gênica de TNF- α no tecido adiposo bem como sensibilidade inalterada à insulina neste tecido. Além disso, ocorreu aumento da expressão de PAI-1 e diminuição da adiponectina no tecido adiposo branco (GAZIOGLU *et al.*, 2015).

A HFD aumenta a expressão de TNF- α e outros fatores que caracterizam o aumento do processo inflamatório no tecido adiposo de camundongos C57BL/6. Além disso, demonstra também que o aumento no processo inflamatório está associado a aumentos concomitantes nos níveis de insulina, leptina e glicose, reforçando a relação do processo inflamatório crônico de baixa intensidade com a resistência insulínica (BRADLEY *et al.*, 2008).

Existe correlação positiva, em obesos, entre os níveis de TNF- α no tecido subcutâneo e alterações no metabolismo glicêmico, corroborando a associação do TNF- α à resistência à insulina na obesidade (VOLP *et al.*, 2008). Os mecanismos da resistência à insulina induzida por TNF- α incluem a aceleração da lipólise elevando ácidos graxos livres na circulação, a diminuição da síntese de GLUT-4 e da expressão do receptor de insulina e do IRS-1 (FJELDBORG *et al.*, 2014).

A leptina é um hormônio peptídeo não glicosilado que desempenha um importante papel na homeostase energética (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). É codificada pelo gene *ob* e produzida principalmente pelo tecido adiposo, particularmente por adipócitos maduros diferenciados. Possui ação no cérebro, principalmente hipotálamo, e em outros tecidos periféricos como células alfa-pancreáticas, fígado e sistema imunológico (ZHANG, DONG MEI; JIAO; KONG, 2017).

Os efeitos metabólicos incluem redução na ingestão energética, estímulo na captação de glicose pelo músculo esquelético, na lipólise no adipócito, na oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos (músculo, fígado e tecido adiposo), na expressão de proteínas desacopladoras (UCPs) em diversos tecidos, na termogênese no TAM tecido adiposo marrom e inibição na gliconeogênese e lipogênese hepática (LEE; SHIN; CHOUE, 2010). A concentração e expressão de leptina estão diretamente associadas à adiposidade, mudanças no peso corporal e estado nutricional. A insulina é um potente ativador da expressão e secreção de leptina. É estimulada também por glicocorticóides, TNF- α e estrógenos (SAAD, ANTONIO F. *et al.*, 2016; SAMPEY *et al.*, 2011). Em humanos a expressão do RNAm de leptina é maior no tecido adiposo subcutâneo que no visceral (TRAN *et al.*, 2019).

Na obesidade, a hiperleptinemia está associada à resistência à leptina, no qual o estoque de gordura está aumentado em relação à capacidade de

oxidação, levando conseqüentemente à esteatose hepática e acúmulo de gordura em tecidos extra-hepáticos, como muscular e pancreático. A hiperleptinemia seguida da resistência à leptina pode ser uma causa da disfunção do adipócitos, e da sobrecarga de lipídios em tecidos periféricos na obesidade, favorecendo o desenvolvimento de resistência à insulina (MASUYAMA *et al.*, 2015).

2.7 Frutose e NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica)

Atualmente, a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) estão relacionadas às crescentes causas de doença hepática e mortalidade e morbidade associadas a doenças do fígado. Existem estimativas variadas de prevalência de NAFLD em geral população, sendo que 17–51% dos adultos têm NAFLD, enquanto uma meta-análise de estudos de 2006-2014 estimou a prevalência de NAFLD de 24% (20–29%) na população em geral, amplamente baseada em estudos de populações nos países europeus (ESTES *et al.*, 2018).

A NAFLD pode ser definida como o acúmulo de fígado de lipídios, principalmente na forma de triglicerídeos, sem ingestão de quantidades significativas de álcool e com a exclusão de outras causas conhecidas de esteatose, como medicamentos e toxinas (MUSSO *et al.*, 2015).

A NAFLD é caracterizada como: tipo 1 - apenas esteatose, tipo 2 - esteatose mais inflamação, tipo 3 - esteatose mais lesão hepatocelular e tipo 4 - esteatose mais fibrose sinusoidal. O NASH é considerado a forma mais séria de NAFLD (tipos 3 e 4) e também está associada à cirrose e carcinoma hepatocelular. A progressão da NAFLD para NASH ocorre por conta de danos causados por peroxidação lipídica e produção de radicais livres. A peroxidação lipídica é acompanhada por um resposta inflamatória e ativação de células estreladas, induzindo fibrogênese (CASTRO *et al.*, 2011; MUSSO *et al.*, 2015).

Day e James (1998) propuseram duas hipóteses para explicar a progressão da esteatose para inflamação, fibrose e cirrose. O primeiro é a esteatose, causada pelo desequilíbrio entre a formação e o turnover dos triglicerídeos. Acredita-se que a resistência à insulina (RI) afeta o primeiro passo da NAFLD da seguinte forma: ativa a secreção de adipocitocinas pelos

adipócitos, altera a taxa de síntese e transporte de triglicerídeos por hepatócitos e aumenta a lipólise em adipócitos que liberam ácidos graxos (ácidos graxos não esterificados - NEFA) na circulação portal, expondo o fígado a níveis excessivos de NEFAs. Levando à diminuição na função mitocondrial e um aumento na taxa de síntese de novo e níveis de triglicerídeos. Na presença de NAFLD, outros fatores, como inflamação e aumento o estresse oxidativo provavelmente leva à progressão para NASH, fibrose e necrose. A segunda é possivelmente causada por adipocinas e espécies reativas de oxigênio, que aumentam a fibrogênese e a peroxidação lipídica.

O excesso no consumo de carboidratos simples, como a frutose provoca a síntese de triacilgliceróis que se acumulam no fígado, e esse acúmulo é a causa da NAFLD (TEIXEIRA *et al.*, 2012). A sua ingestão também está ligada à gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica, sendo visível que pacientes com NAFLD com maior consumo de frutose aumentaram inflamação e fibrose do fígado (PARKS *et al.*, 2008). As dietas ricas em frutose constituem um modelo experimental para NAFLD em que os animais começam a se exibir resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensão (MASUYAMA *et al.*, 2015).

2.8 O potencial transgeracional da obesidade

O aumento mundial da obesidade tem sido amplamente atribuído ao ambiente obesogênico, o consumo de *junk food* e comportamentos sedentários. A mudança na distribuição do peso corporal também pode depender de inúmeras outras e mudanças comportamentais (QASIM *et al.*, 2018; WESTERTERP; SPEAKMAN, 2008). No entanto, uma proporção significativa da população exposta a esse ambiente não se torna obesa (QASIM *et al.*, 2018). Embora diferenças interindividuais no peso corporal possam ser influenciadas por variações genéticas nos genes relacionados ao metabolismo energético, o genoma humano não evoluiu no mesmo ritmo de aumento de prevalência da obesidade aumentou. No geral, isso sugere que os fatores causais subjacentes à obesidade são mais complexos do que se pensava anteriormente (MADSEN *et al.*, 2018) .

Em particular, estudos em modelos animais e humanos demonstram que a superalimentação materna, pode conferir risco aumentado de obesidade na prole por transmissão 'agenética' comumente referido como o 'ciclo intergeracional da obesidade'. Os mecanismos precisos pelos quais a exposição às perturbações ambientais pode influenciar os resultados a longo prazo são complexos e dependem do tipo, hora e gravidade da exposição (LECOUTRE *et al.*, 2017).

Os efeitos deletérios da obesidade materna ocorrem durante períodos específicos de gravidez e pós-natal em que memórias epigenéticas podem ser adicionalmente configuradas ou moduladas. Para a programação do tecido adiposo, o período sensível coincide com o da adipogênese (LECOUTRE *et al.*, 2018). No entanto, o tempo de desenvolvimento da adipogênese difere consideravelmente entre as espécies. Em roedores, a adipogênese é particularmente ativa durante o período perinatal. Esses processos ocorrem principalmente durante a última semana de gestação (as primeiras células adiposas aparecem entre os dias 14 e 18 de gestação) (BERRY; JIANG; GRAFF, 2016; HOLTRUP *et al.*, 2017) e acelera durante a vida pós-natal precoce até que os filhotes sejam completamente desmamados. Como resultado, as células-tronco dos adipócitos são particularmente sensíveis aos fatores maternos durante a lactação (LECOUTRE *et al.*, 2017).

Em ambas as espécies, a expansão do TA envolve hiperplasia e hipertrofia (BERRY; JIANG; GRAFF, 2016; JIANG, X *et al.*, 2013) de uma maneira específica para sexo e depósitos subcutâneos versus viscerais (BERRY; JIANG; GRAFF, 2016). Está bem estabelecido que o TA hipertrófico exibe um fenótipo metabólico mais pernicioso comparado ao TA hiperplásico.

Estudos em roedores sugerem que os mecanismos moleculares que conduzem a hiperplasia adipocitária em uma HFD são distintos aos mecanismos que regulam o estabelecimento do número de adipócitos durante o desenvolvimento (JIANG, X *et al.*, 2013). Além disso, o período perinatal é um período de rápido crescimento e remodelamento epigenético do TA, durante o qual a progênie é particularmente sensível à fatores de maneira específica ao sexo e ao local de depósito do tipo de tecido adiposo. É possível que processos epigenéticos induzidos durante o desenvolvimento persistam ao longo da vida,

fornecendo uma base para a memória celular, criando o “link” entre a obesidade materna ao aumento do risco de adiposidade na prole (WATANABE *et al.*, 2018).

2.8.1 Programação do Desenvolvimento e Transmissão Transgeracional da Obesidade

Um ambiente adverso nos períodos de pré-concepção, gestação e lactação parece afetar o fenótipo da prole em desenvolvimento e das gerações subsequentes, mesmo sem estressores ambientais (SARKER *et al.*, 2019). Por exemplo, quando a mãe grávida é obesa, três gerações são efetivamente expostas simultaneamente: a mãe grávida (F0), o feto (F1) e a linha germinativa do feto (o futuro F2). Estes são considerados efeitos parentais diretos sobre o sistema somático de células do embrião F1 em desenvolvimento e / ou feto e, também, no desenvolvimento de células germinativas (que se tornarão gametas adultos de F1) e, por sua vez, podem afetar a prole de F2 (LECOUTRE *et al.*, 2018). Assim, a exposição direta durante o período perinatal da mãe obesa F0 pode ter efeitos intergeracionais em F1 e F2. Portanto, um efeito transgeracional é encontrado em gerações que não eram diretamente expostos ao insulto (HOLTRUP *et al.*, 2017).

Embora a implicação dos mecanismos epigenéticos nos efeitos intergeracionais seja amplamente aceita, a herança transgeracional que requer uma transmissão epigenética da linha germinativa ainda é uma questão de debate. Uma grande limitação à herança epigenética é a reprogramação epigenômica. Isso ocorre durante o desenvolvimento embrionário e a maturação da linha germinativa, quando o DNA e as modificações são redefinidas (KIRCHNER *et al.*, 2010).

A exposição à HFD materna em camundongos resultou no aumento da massa corpórea e em redução da sensibilidade à insulina que permaneceu até a geração F2, tanto via linhagens paterna e materna (DUNN; BALE, 2009). Trabalhos adicionais, analisando a geração F3 mostraram que as fêmeas exibiam massa corpórea aumentada e os machos alterações na homeostase da glicose, porém esses efeitos só foram transmitidos via linhagem paterna (LECOUTRE *et al.*, 2018).

O estudo de Sarker et al. (2019) mostrou a contribuição da exposição materna à HFD em diferentes estágios de pré-concepção, gestação e lactação para induzir fenótipos relacionados a distúrbios metabólicos. A exposição materna à HFD no período pré-concepção a curto prazo não afeta a fisiologia dos filhos. Porém, na lactação leva ao aumento dos níveis de dopamina, que pode precipitar os sintomas positivos à característica obesogênica na descendência.

Essas observações exigem investigações adicionais para identificar os mecanismos envolvidos nesse período específico e fornecer novos alvos para intervenções terapêuticas precoces, a fim de reverter a epidemia de obesidade em mulheres em idade fértil e, por sua vez, minimizar as consequências para a saúde da geração futura (SARKER et al., 2019; DONKIN; BARRÉS; 2018; AIKEN; OZANNE, 2014).

2.9 A microbiota intestinal

O corpo humano, desde a pele até o trato gastrointestinal, é colonizado por um conjunto diversificado de microrganismos, denominado microbioma, composto por bactérias, vírus, fungos e protozoários. Os principais filos de bactérias encontrados são: Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria (RIBEIRO; RIBEIRO, 2017).

As funções de absorção nutricional, proteção contra patógenos invasores, restrição na passagem de substâncias e secreção hormonal são características do epitélio intestinal. O intestino é composto por quatro agrupamentos de células: placas de Peyer, lâmina própria, linfonodos mesentéricos e linfócitos intra-epiteliais (HUTTENHOWER *et al.*, 2012), e é considerado o maior compartimento do sistema imunológico do corpo humano. A diferenciação e renovação celular acontecem em células multipotentes próximas à base da cripta e as novas células migram em direção ao ápice da vilosidade, com exceção das células de Paneth, cuja rota é descendente rumo à base da cripta (LONG *et al.*, 2016; NG *et al.*, 2014).

A composição da microbiota pode variar em diferentes regiões do corpo humano, sendo que a microbiota intestinal apresenta maior diversidade e complexidade de microrganismos, competindo apenas com a cavidade oral. A

exposição a uma baixa diversidade bacteriana nos primeiros dias de vida, inibe ou atrasa a maturação do sistema imunitário da mucosa intestinal, aumentando as respostas imunitárias exacerbadas e as doenças alérgicas, sendo este o fundamento da hipótese da higiene, que sugere que infecções na primeira infância diminuem a tendência para desenvolver doenças alérgicas. (THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014b).

A estabilidade da microbiota intestinal é alcançada ainda na infância e, no adulto, existe uma estabilidade considerável, porém as proporções dos filos bacteriano podem variar entre indivíduos (UMU *et al.*, 2016), devido a genética, o estado nutricional, hábitos alimentares, estado de saúde e prática de exercício físico (CODELLA; LUZI; TERRUZZI, 2018; WHITE *et al.*, 2013; LEY *et al.*, 2005)

A microbiota intestinal e seu hospedeiro estabelecem uma relação simbiótica, na qual as bactérias possuem capacidade de assimilar e modificar componentes do seu ambiente e produzir novas moléculas que podem ser benéficas ou malélicas. Essa relação entre a microbiota e o hospedeiro influencia a proteção das mucosas intestinais, o metabolismo, inclusive na degradação de alimentos, a fisiologia e a função imune do hospedeiro, de modo que a consequência desta associação pode ser positiva ou negativa para saúde e/ou para doença (ZHANG, CHENHONG *et al.*, 2010).

Em indivíduos obesos pode-se observar na microbiota intestinal a prevalência de genes bacterianos relacionados ao processo inflamatório. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como as observadas na obesidade, e a hiperinsulinemia alteram as propriedades de barreira do epitélio intestinal, que é a primeira linha de defesa do organismo contra ingestão de agentes tóxicos, propiciando o extravasamento da endotoxina da membrana externa de bactérias gram-negativas na circulação portal, expondo o fígado aos lipopolissacarídeos e contribuindo para as morbidades relacionadas ao excesso de peso (BRUN *et al.*, 2007).

Evidências apontam que a colonização microbiana pode começar *in utero* e que, a depender do tipo de microbiota, observam-se partos prematuros, distúrbios metabólicos, gastrointestinais e alérgicos. Porém, ainda não é possível determinar as ligações entre microrganismos específicos e as comorbidades na mulher grávida e no bebê. Sugere-se que a colonização primária prediga a ecologia microbiana e a imunidade tardias

(LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016). Sabe-se que a colonização por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em adultos é protetora contra distúrbios metabólicos, sendo estes os probióticos mais amplamente estudados (WALKER *et al.*, 2017; CLAYTON *et al.*, 2015).

Não há consenso sobre o tamanho e a composição da microbiota intestinal saudável, entretanto, sugere-se que a contagem inferior a 480.000 genes bacterianos está relacionada à maior adiposidade, RI, dislipidemia e inflamação sistêmica (COTILLARD *et al.*, 2013; LE CHATELIER *et al.*, 2013; TURNBAUGH *et al.*, 2009). Apesar de não ser possível estabelecer um papel causal da microbiota intestinal no desenvolvimento das alterações metabólicas relacionadas à obesidade, estudos com intervenção dietética sugerem que a modulação da microbiota intestinal pode melhorar parâmetros de risco metabólico (LUNDBERG *et al.*, 2017).

2.9.1 A microbiota intestinal na gestação

A alteração da composição das bactérias da microbiota intestinal pode modular a saúde do hospedeiro, afetando o seu metabolismo, imunidade e hormônios. Estas mudanças também são observáveis na gravidez e à medida que esta progride. Estudos sugerem que a microbiota sofre profundas mudanças na gravidez associadas a adaptações fisiológicas e imunológicas durante este período (CHEN *et al.*, 2017; WALKER *et al.*, 2017).

Sabe-se que a composição da microbiota intestinal varia ao longo da gestação, mas no primeiro trimestre é semelhante à da mulher não grávida. Com o avançar da gestação ocorre aumento do filo Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e redução de Bacteroidetes (JORDAN *et al.*, 2017; NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016). Ainda no período pré-natal, a microbiota exerce influência no metabolismo materno, e fetal (WALKER *et al.*, 2017). Por essa razão, modificações na sua composição relacionam-se ao parto prematuro, complicações cardiometabólicas, enterocolite necrosante, eclâmpsia, morte fetal intrauterina, restrição do crescimento do feto e obesidade (JORDAN *et al.*, 2017; NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016).

2.9.2 A microbiota vaginal e placentária

O gênero mais expresso na microbiota vaginal é o *Lactobacillus*, sendo associado à saúde e normalidade vaginal. As espécies mais frequentemente isoladas são: *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus iners*. Estas espécies são produtoras de ácido láctico, que mantém o pH baixo, inferior a 4,5, e bacteriocinas que conferem proteção contra a invasão de organismos patogênicos, prevenindo, assim, infecções do trato urogenital (NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016).

Quando ocorrem falhas nas barreiras de proteção podem ocorrer complicações como a vaginose bacteriana, levando ao parto prematuro, a infecção do fluido amniótico e corioamniotite. Pensa-se que a maioria destas infecções ocorrem quando micro-organismos da parte inferior do trato genital ascendem e acedem ao fluido amniótico (VINTURACHE *et al.*, 2016). Porém, sabe-se que ao longo da gravidez, há aumento das espécies de *Lactobacillus*, cuja principal função é a proteção contra bactérias patogênicas (CHEN *et al.*, 2017; NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016).

Evidências sugerem a presença, em baixa densidade, de bactérias comensais, quebrando o paradigma do ambiente estéril desse órgão. Porém, é preciso uma avaliação detalhada para que esse resultado não seja por translocação, no processo de obtenção das amostras, principalmente quando o parto é vaginal. Entre seus efeitos, ainda a esclarecer, está o fornecimento de determinantes antigênicos, favorecedores do desenvolvimento da imunidade inata (PELZER *et al.*, 2017; HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Estudos sugerem que a maior parte das infecções intra-uterinas associadas ao parto prematuro, têm origem no trato genital inferior e ascendem ao ambiente intrauterino. Contudo, recorrendo a tecnologias de análise de material genético, a maior parte das espécies detectadas na placenta não se assemelham às do trato urogenital, mas sim às comensais da cavidade oral (PRINCE *et al.*, 2016; HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Porém, apesar do esforços e estudos recentes, a placenta continua sendo um dos órgãos menos conhecidos do corpo humano no que diz respeito à sua microbiota.

2.10 Microbiota, permeabilidade intestinal e a inter-relação com o consumo alimentar

O consumo alimentar pode influenciar a composição da microbiota intestinal, e esta por sua vez pode interagir com o metabolismo do seu hospedeiro (WHITE *et al.*, 2013). Vários autores hipotetizam que esse efeito é decorrente da qualidade e quantidade dos nutrientes ofertados pela dieta e sua capacidade de proporcionar um ambiente favorável às bactérias intestinais, estimulando seletivamente a proliferação e/ou atividade de bactérias desejáveis (THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014; DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2013). Assim, a capacidade de interação, adaptação e competição da microbiota por substrato determina a sua presença e abundância no microbioma intestinal (WHITE *et al.*, 2013).

Dentre os componentes alimentares que podem modular a microbiota intestinal estão os prebióticos, que são carboidratos não digeríveis e lignina presentes de forma intacta nas plantas, e as fibras funcionais, que são carboidratos não digeríveis isolados e que apresentam efeitos fisiológicos benéficos. Fibras dietéticas e funcionais, proteínas ou peptídeos que não são digeridos pelas enzimas do trato gastrointestinal sofrem fermentação pela microbiota do ceco e do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (HUTTENHOWER *et al.*, 2012; LEY *et al.*, 2005).

São três, os principais AGCC sintetizados: acetato, propionato e butirato. O acetato desempenha papel no controle do consumo alimentar, o propionato na diminuição de triglicerídeos hepáticos e aumento à sensibilidade insulínica, e o butirato, por ser fonte de energia para células intestinais, como os enterócitos e atua na prevenção da obesidade (MCNABNEY; HENAGAN, 2017; WEITKUNAT *et al.*, 2016). Em menor quantidade pode ocorrer a produção de isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato, sendo que estes últimos são originários da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada valina, isoleucina e leucina (COATE *et al.*, 2013; GIBSON; FULLER, 2000).

Esta complexa interação entre consumo alimentar, microbiota e hospedeiro evidencia a habilidade das bactérias atuarem na recuperação de energia da dieta, na transformação de carboidratos digeríveis, aminoácidos e

vitaminas (WIKOFF *et al.*, 2009), participando das vias metabólicas do hospedeiro (WHITE *et al.*, 2013).

As bactérias que colonizam o intestino humano desempenham papel de destaque na gênese da obesidade e de outras DCNT, como DM2 e a aterosclerose (KOETH *et al.*, 2013; LARSEN *et al.*, 2010). O estudo de Zhang *et al.* (2010) mostrou que ratos, alimentados com dieta hiperlipídica, apresentam diminuição de Bacteroidetes e Firmicutes. Um estudo com diferentes tipos de dietas revelou que o enterótipo *Bacteroides*, em seres humanos, está associado com pessoas cuja dieta contém mais gordura saturada durante longos períodos de tempo, enquanto o enterótipo *Prevotella* é predominante em pessoas que consomem mais carboidratos.

A dieta pode influenciar no desenvolvimento da endotoxemia, entre os fatores dietéticos, a ingestão de gordura saturada e frutose tem se destacado, uma vez que dietas tipicamente ocidentais são caracterizadas por maior consumo de lipídios e carboidratos, o que pode justificar, o alto índice de DCNT em países ocidentais (MUSSO *et al.*, 2015). Outros compostos, tais como probióticos podem influenciar o LPS circulante, de maneira a diminuir os seus valores (TAIRA *et al.*, 2015; DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2013; LAPARRA; SANZ, 2010; MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010; SPRUSS *et al.*, 2009).

Dietas ricas em gordura são dadas para induzir obesidade e alterações metabólicas em modelos animais e parecem estar associadas a aumentos na concentração plasmática de LPS. O teor de gordura e a composição das refeições influenciam a ocorrência e o tempo de pico na concentração de LPS. É possível que, quanto mais rápido for o pico de LPS e retornar aos níveis basais, menor a ativação inflamatória (AMAR *et al.*, 2008; JIALAL; DEVARAJ, 2018; MOREIRA, 2013).

O potencial de uma dieta hiperlipídica em elevar os níveis de LPS no sangue tem sido confirmada em estudos com seres humanos (HARDIKAR *et al.*, 2015; LAUGERETTE *et al.*, 2014). Considerando a dieta ocidental, sugere-se a adoção de dietas com conteúdo normolipídico. Um estudo avaliou o consumo de duas refeições isocalóricas (910 kcal) em indivíduos saudáveis e eutróficos, com índice de massa corporal < 25 kg/m², sendo uma refeição hiperlipídica e a outra normolipídica: dieta 1: 41% de carboidratos, 42% de lipídios e 17% de proteínas; dieta 2: 58% de carboidratos, 27% de lipídios e 15% de proteínas, segundo

recomendações da American Heart Association. A refeição rica em lipídio induziu os seguintes aumentos: LPS plasmático, expressão do TLR-4 e geração de espécies reativas de oxigênio (GHANIM; SIA; UPADHYAY, 2011).

Mais do que conteúdo total de lipídio, o perfil de AG da dieta parece ter impacto na endotoxemia. Fontes de gordura (gordura do leite, óleo de palma, colza e girassol) que diferem em seu perfil de ácidos graxos foram dadas aos roedores. O início da inflamação não se correlacionou com o ganho de peso corporal. A endotoxemia não foi associada ao conteúdo de gordura na dieta (22% vs. 3% do conteúdo calórico total), mas sim à qualidade lipídica. Apesar da endotoxemia aparentemente mais alta, o grupo alimentado com colza mostrou inflamação menor do que o grupo alimentado com o óleo de palma. Como os óleos de colza e girassol e a gordura do leite resultaram em níveis plasmáticos semelhantes de citocina pró-inflamatória, apesar das diferentes estruturas de ácidos graxos e TG, ainda são necessários estudos para elucidar as diferenças e semelhanças entre as diferentes fontes de gordura (LAUGERETTE *et al.*, 2014).

A translocação de LPS, favorecida pelo consumo de dietas ricas em lipídios e frutose, pode ser compensada com a administração de probióticos, por meio da melhora na microbiota e permeabilidade intestinal (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; TAIRA *et al.*, 2015; THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014^a; MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010). Um estudo com camundongos tratados com HFD, mostrou que quando suplementados com *Lactobacillus johnsonii* BS15, foi capaz de impedir a NAFLD induzida por HFD através da melhora da disfunção mitocondrial e redução da permeabilidade intestinal, observado pelo nível sérico de LPS, por meio da modulação da microbiota intestinal (CANI *et al.*, 2008).

O transplante de microbiota fecal (FMT) de roedores magros, alimentados com dieta controle e obesos (HFD) para animais germ-free foi eficaz em mostrar o ganho de adiposidade e maior extração de calorias provenientes da dieta daqueles animais transplantados com a microbiota de obesos, comparados aos que receberam a microbiota de animais magros, mesmo sem acréscimo no consumo de ração. Dessa forma, sugere-se que as características da microbiota dos animais obesos por si só, contribuem para o acúmulo de gordura e ganho

de peso (THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014a HARRIS; KASSIS; CHOU, 2012).

Apesar dos inúmeros estudos, ainda não se pode afirmar qual a exata relação entre os macronutrientes da dieta e a alteração de vias metabólicas que darão origem as DCNT por meio da alteração da microbiota intestinal.

2.11 A disbiose intestinal

A disbiose é uma alteração na composição da microbiota, associada ao desequilíbrio entre bactérias protetoras e bactérias patogênicas, com redução da diversidade taxonômica de espécies (DE ALMADA *et al.*, 2015). Pode ser ocasionada por agentes patogênicos endógenos, quer seja pela inflamação reativa no hospedeiro, uso de antibióticos e doenças de base ou fatores externos, como a dieta e o meio ambiente em que o indivíduo se encontra (MIZOCK, 2015).

A disbiose apresenta um agravante quando associada com outros distúrbios, como aumento da permeabilidade intestinal e a constipação intestinal. Em uma microbiota anormal, a quebra dos peptídeos e reabsorção de toxinas do lúmen intestinal, ocorrem de maneira inadequada, induzindo o surgimento de doenças pelo não funcionamento das funções da microbiota intestinal (PETERSON *et al.*, 2015)

Estudos sugerem que uma microbiota intestinal com baixa diversidade bacteriana está associada ao risco aumentado de doenças gastrointestinais como a síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e diarreias infecciosas, além de doenças extraintestinais como alergias e doenças metabólicas, como a obesidade (DE ALMADA *et al.*, 2015; THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014b). Ainda é difícil e seria importante afirmar, nesta associação, se a alteração da composição da microbiota é causa da doença, ou se essa alteração é consequência de uma microbiota intestinal patológica (PETERSON *et al.*, 2015).

Um dos fatores que tem importante contribuição para o desequilíbrio da microbiota intestinal é a má digestão, em que o estômago produz ácido insuficiente para extinguir as bactérias patogênicas ingeridas na maioria das

vezes com alimentos. Além disso, outros fatores com importância clínica são o abuso do laxante, o consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras saturadas e frutose, exposição a toxinas ambientais e o estado imunológico do hospedeiro. O efeito de alguns antibióticos permanece por longos períodos, produzindo, uma seleção dos microorganismos, proporcionando a perda da microbiota comensal e a propagação de bactérias patogênicas (DE ALMADA *et al.*, 2015).

O desequilíbrio da microbiota pode levar a perda de efeitos imunes normais reguladores na mucosa do intestino, sendo associada a um número de doenças inflamatórias e imuno mediadas. Obter uma homeostase adequada durante o momento de colonização do trato gastrointestinal é um dos principais elementos para a modulação adequada do sistema imune e indução da tolerância imunológica (LE CHATELIER *et al.*, 2013).

2.12 Evidências de disbiose intestinal na obesidade

Durante os últimos anos, os estudos relacionados com a interação entre a população de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal e o hospedeiro têm alcançado grande relevância. Sabe-se que a microbiota intestinal está envolvida em numerosas funções biológicas intestinais, como por exemplo: na defesa do hospedeiro frente a patógenos invasores, no desenvolvimento da imunidade de mucosas, das microvilosidades intestinais e na degradação de polissacarídeos não digeríveis como a inulina (CANI;EVERARD, 2016; CANI; DELZENNE, 2009).

Estudos mostram o envolvimento da microbiota intestinal no ganho de peso corporal. Neste sentido, um estudo mostrou que o FMT de camundongos obesos, mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) para camundongos germ-free, ocasionou o aumento de 60% no peso corporal destes animais (BÄCKHED *et al.*, 2004). Outro estudo observou que o desenvolvimento de obesidade tem sido associado a mudanças na composição e proporção das populações bacterianas presentes na microbiota intestinal, processo denominado de disbiose intestinal (EVERARD *et al.*, 2013). Foi observado que tanto em modelos animais de obesidade como em humanos com sobrepeso, existe uma proporção diferencial em 2 filos principais de bactérias: maior

abundância de Firmicutes e menor de Bacteroidetes quando comparados com os controles magros (DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2013).

De maneira interessante, o consumo de uma dieta rica em lipídios também foi associado com a redução da abundância relativa das bactérias *Bifidobacterium* (CANI; DELZENNE, 2009). De fato, alterações dessas bactérias estão correlacionadas ao aumento da capacidade de obtenção de energia e ao aumento dos níveis de LPS circulantes, o que leva ao desenvolvimento de processo inflamatório sistêmico de baixo grau e resistência à insulina. Corroborando com esses dados, foi demonstrado que a prevalência de *Bifidobacterium* no intestino está associada à diminuição dos níveis de LPS, melhora da barreira intestinal e redução de ganho de peso corporal (CANI; DELZENNE, 2011; ZHANG, CHENHONG *et al.*, 2009).

Apesar da maioria dos estudos constatarem a diminuição da razão de Bacteroidetes/Firmicutes em pacientes obesos ou com DM2, existem outros resultados que sugerem dados contrários a estes já estabelecidos na literatura (SERINO *et al.*, 2012; WU, GARY D *et al.*, 2010). Contudo, diversas evidências reforçam a hipótese de que a microbiota intestinal constitui um elemento chave no desenvolvimento de doenças metabólicas. De fato, foi demonstrada reduzida inflamação no tecido adiposo e normalização dos parâmetros metabólicos relacionados à obesidade e DM2 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos (WU, GARY D *et al.*, 2010).

2.13 Probióticos

2.13.1 Características e propriedades

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais usadas como probióticos, mas o *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces boulardii* e algumas espécies de *E. coli* também são usadas. O termo “probiótico” deve ser reservado para os micróbios vivos que, em estudos humanos controlados, demonstraram produzir benefícios à saúde (GUARNER *et al.*, 2017).

Para que o probiótico seja considerado eficaz, precisa cumprir determinadas características: os benefícios para o hospedeiro têm de estar comprovados, a sua ingestão não pode representar um risco para o hospedeiro, quer de toxicidade ou patogenicidade, devendo ser reconhecido como seguro; os organismos vivos devem ser capazes de atingir o cólon e colonizar o TGI; o probiótico tem de manter as suas características e a sua estabilidade durante o processo de armazenamento e conservação na matriz, caso seja incorporado (BUTEL, M.-J.; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; MIZOCK, 2015).

Para ser eficaz, o probiótico precisa chegar ao local de ação em quantidade adequada, e para isso precisa sobreviver ao ambiente ácido do estômago, ao pH do meio e a presença de sais biliares duodenais na porção inicial do intestino delgado. Dessa forma, são selecionados os microrganismos com maior capacidade de resistência a tais condições, tendo também sido desenvolvidos métodos que permitem a encapsulação dos probióticos com esse propósito (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; MIZOCK, 2015; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

De forma a alcançar o intestino delgado e modular positivamente a microbiota local, os probióticos requerem uma matriz específica que garanta a sua sobrevivência ao longo do TGI. Algumas formulações consistem na incorporação dos probióticos em produtos alimentares como o leite, o kefir ou os iogurtes. Existem já formulações que utilizam outros alimentos menos convencionais como cereais, queijo, salsichas, bolachas ou, mais recentemente, chocolate. Os probióticos também podem ser administrados como preparados farmacológicos com diversas formas de liberação, como cápsulas, comprimidos ou pó (GUARNER *et al.*, 2017; LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

As recomendações para o uso de probióticos, especialmente na prática clínica, devem ligar as cepas específicas com os benefícios declarados a partir de estudos em seres humanos. Algumas cepas têm propriedades singulares que podem explicar certas atividades neurológicas, imunológicas e antimicrobianas. Entretanto, um conceito emergente no campo dos probióticos é reconhecer que alguns mecanismos da atividade probiótica estão compartilhados provavelmente

entre as diferentes cepas, espécies ou inclusive gêneros (GUARNER *et al.*, 2017).

Muitos probióticos podem funcionar de maneira similar com respeito à sua capacidade de promover resistência à colonização, regular o trânsito intestinal ou normalizar a microbiota alterada. Por exemplo, a capacidade de melhorar a produção de ácidos graxos de cadeia curta ou de reduzir o pH luminal no cólon pode ser o benefício principal expressado por muitas cepas de diferentes probióticos (THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014a; WU, GARY D *et al.*, 2012). Se o objetivo do consumo de probiótico for melhorar a saúde do hospedeiro, preparações contendo quantidades adequadas de espécies fermentadoras bem-estudadas são suficientes (GUARNER *et al.*, 2017).

2.13.2 Mecanismos de ação

Os probióticos afetam as bactérias intestinais aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos. Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, gerando produtos metabólicos finais, como ácidos graxos de cadeia curta, e se comunicando com as células do hospedeiro através de sinais químicos (THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014a).

Estes mecanismos podem conduzir ao antagonismo de patógenos potenciais, a melhorar o ambiente intestinal, fortalecer a barreira intestinal, à regulação negativa da inflamação e à regulação positiva da resposta imune (BARZ *et al.*, 2015).

Há três mecanismos gerais através dos quais os probióticos exercem os seus efeitos benéficos:

I. Reforço da barreira epitelial intestinal

A função de barreira intestinal é mantida pelas células mucosas responsáveis pela produção de muco que funciona como uma barreira física à passagem de células estranhas; pelas TJ que ligam as extremidades apicais das

células epiteliais e ainda pelas células de Paneth, produtoras de peptídeos antimicrobianos como as defensinas e as lisozimas (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; DE ALMADA *et al.*, 2015).

Os probióticos favorecem a integridade da barreira epitelial intestinal por meio da sua capacidade de adesão às células epiteliais e estímulo da produção de muco, pelo aumento da expressão de genes codificadores das proteínas de junção e estímulo à produção de defensinas (BUTEL, M. J., 2014; HARDER *et al.*, 2007).

II. Efeito Antimicrobiano

Os probióticos têm a capacidade de manter e restaurar o equilíbrio microbiano através de ações que compreendem dois principais mecanismos, o de competição através da ocupação de nichos funcionais livres e outro de lesão direta ou indireta dos microrganismos patogênicos (DE ALMADA *et al.*, 2015; EREJUWA; SULAIMAN; AB WAHAB, 2014).

Os nutrientes essenciais ao desenvolvimento de quase todos os microrganismos, são utilizados pelos probióticos, deixando menos destes disponíveis para o crescimento daqueles patogênicos. Além disso, a disputa ocorre a nível da adesão ao muco e às células epiteliais através dos receptores disponíveis, desta forma, a ocupação dos locais de ligação ao epitélio pelos probióticos, impede a sua ocupação por microrganismos estranhos (DE ALMADA *et al.*, 2015; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; HARDER *et al.*, 2007).

Através do efeito bacteriostático indireto os probióticos lesionam os microrganismos invasores ao criar um microambiente hostil ao crescimento de outros microrganismos através da redução do pH intestinal, resultante da formação de AGCC e de ácidos orgânicos como o ácido láctico, o ácido propiônico e o butirato. A alteração qualitativa da mucina intestinal é outra ação dos probióticos que está envolvida na criação deste ambiente adverso à colonização por outros microrganismos (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018). Alguns são ainda capazes de produzir conjugados de ácidos biliares que têm uma forte atividade antimicrobiana, bem como metabólitos capazes de inibir o crescimento de alguns fungos e bactérias gram negativas (DE ALMADA *et al.*, 2015; BISCHOFF *et al.*, 2014).

III. Modulação do sistema imunitário e da resposta inflamatória

Os probióticos são capazes de modular o sistema imunitário do hospedeiro interagindo com diversas células imunitárias, localizadas ao nível do TGI, que representam mais de 70% da totalidade de células envolvidas no sistema imune do hospedeiro (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018).

A resposta imunitária é ativada pelo reconhecimento dos organismos estranhos, mediada por receptores específicos de células da imunidade inata como as células epiteliais, as células dendríticas e os macrófagos. Estes receptores, são denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRR) e são reconhecidos por componentes estruturais da superfície dos microrganismos (MAMPs) que por sua vez interagem com o epitélio intestinal, estimulando as células do sistema imunitário intestinal ao nível da lâmina própria. As células T reguladoras são ativadas e diferenciam-se em linfócitos Thelper, o que induz a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias. Os probióticos poderão, por isso, ter diferentes efeitos dependendo do perfil de citocinas produzido (BUTEL *et al.*, 2014; KOETH *et al.*, 2013).

As células epiteliais do hospedeiro são das que mais interagem com os probióticos através de moléculas de reconhecimento e receptores que estimulam a produção de citocinas, capazes de inibir a apoptose celular e estimular a regeneração das células epiteliais (YIU; DORWEILER; WOO, 2017).

Os probióticos atuam também sobre as células dendríticas potencializando as suas funções no reconhecimento bacteriano e na modulação da resposta pelos linfócitos T (DE ALMADA *et al.*, 2015). A interação com monócitos e macrófagos locais que atuam na primeira linha da imunidade inata, bem como a interação com células mediadoras da resposta adaptativa específica (linfócitos T e linfócitos B) é também conseguida pelos probióticos, que exercem um papel anti-inflamatório e protetor importante. Assim, os efeitos dos probióticos podem ser locais, limitados ao estímulo da imunidade intestinal, ou sistêmicos (CHEN *et al.*, 2017; YIU; DORWEILER; WOO, 2017).

2.13.3 Segurança

Probióticos como os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, são genericamente considerados seguros devido ao seu uso extensivo, durante décadas, por milhões de indivíduos saudáveis e doentes, com uma baixa prevalência de casos de toxicidade associados ao seu uso (WANG *et al.*, 2015). A distinção entre microrganismos comensais e patogênicos torna-se essencial ao longo do trato gastrointestinal. No entanto, esta diferenciação nem sempre é evidente, principalmente em situações de vulnerabilidade do hospedeiro consequente a um defeito da barreira intestinal ou a alguma susceptibilidade genética, que permita uma ruptura e invasão facilitada pelos microrganismos (GUARNER *et al.*, 2017).

Quando o organismo detecta sinais de lesão ou estresse iniciados por meio da alteração da microbiota intestinal, ocorre a ativação da cascata de respostas imunológicas, processo mediado por complexos multiproteicos, para restabelecimento do equilíbrio das bactérias intestinais e detecção de microrganismos patogênicos (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O microbioma do hospedeiro pode interferir na sua saúde de forma favorável ou desfavorável, representando um risco para a sua saúde. Alguns fatores determinam a ocorrência de uma das duas, que incluem, entre outros, a idade, a dieta, o ambiente em que vive e a genética. Um exemplo é o *Helicobacter pylori*, naturalmente adquirido durante a infância, que pode atuar de forma benéfica em jovens contra a asma e infecções ou ainda, na fase adulta, protegendo de complicações associadas ao refluxo gastro esofágico. Pode, no entanto, representar um fator de risco para o desenvolvimento de úlcera péptica, ainda que numa minoria dos adultos infectados e, numa idade mais avançada, facilitar o desenvolvimento de carcinoma gástrico (GUARNER *et al.*, 2017).

Quase toda a experiência com probióticos aponta que o efeito probiótico é específico de uma estirpe, pelo que, tanto os benefícios como a segurança de um probiótico não pode ser extrapolada para outras espécies, sendo sempre necessários estudos de qualificação (GUARNER *et al.*, 2017; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; WANG *et al.*, 2015).

2.13.4 Características do Biorich®

O Biorich® é um fermento láctico probiótico com culturas selecionadas concentradas de *Streptococcus thermophilus* = 1×10^8 UFC/g, *Bifidobacterium bifidum* BB-12 = 1×10^6 UFC/ e *Lactobacillus acidophilus* LA-5= 1×10^6 UFC.

A *Bifidobacterium bifidum* é anaeróbica, gram-positiva e imóvel. São prevalentes no cólon e outros sítios como vagina e cavidade bucal. As bifidobactérias fermentam açúcares com produção principalmente de ácido acético e ácido láctico. Tem sido aplicada no tratamento da intolerância à lactose, redução do colesterol, restauração da microbiota intestinal após uso de antibióticos e ativação do sistema imune (NOGUEIRA, 2011).

O *Lactobacillus acidophilus* é um bastonete gram-positivo, não formador de esporo, produtor de bacteriocinas, ácido láctico e peróxido de hidrogênio. Sua principal função está relacionada à manutenção da microbiota por meio da ativação do sistema imunológico, competição com microrganismos patogênicos pela adesão ao epitélio intestinal. Além disso, auxiliam no controle da diarreia, na redução do colesterol LDL através da conversão do coprostanol e previnem a síndrome do supercrescimento bacteriano (SIBO). Estudos apontam que quando combinadas, as cepas BB-12® e LA-5® são capazes de recolonizar a microbiota intestinal (CHATTERJEE *et al.*, 2013; DE VRESE *et al.*, 2011).

O *Streptococcus thermophilus* também é uma bactéria produtora de ácido láctico e exerce efeito bactericida e bacteriostático, eliminando as bactérias patogênicas sensíveis à diminuição do pH. Porém, sua função mais conhecida está relacionada ao aumento na sinalização de células capazes de reduzir a resposta inflamatória e por consequência, a produção de citocinas inflamatórias. Também libera enzimas que exercem efeitos sinérgicos na digestão, aliviando sintomas de má absorção intestinal, promove adesão com células epiteliais e produção de muco, favorecendo a integridade da barreira epitelial intestinal (SAAVEDRA *et al.*, 2004).

2.14 Estratégias terapêuticas na modulação da microbiota intestinal

2.14.1 A alimentação como moduladora da microbiota intestinal

Acumulam-se evidências que hábitos alimentares associam-se à obesidade e de que composição da microbiota exerce papel relevante na interação dieta e risco de doenças (TRAN *et al.*, 2019; BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; KIM, SUN WOO *et al.*, 2013; KOETH *et al.*, 2013).

A composição e a diversidade da microbiota são consideradas importantes para determinar a simbiose entre hospedeiro e bactérias. Certos padrões dietéticos otimizam esta simbiose (WU, CHIEN CHEN *et al.*, 2015). Pesquisadores sugerem que a qualidade da dieta é responsável por 57% da variação da composição da microbiota, enquanto apenas 12% estariam relacionados a fatores genéticos (LI *et al.*, 2019; BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018; CANI; EVERARD, 2016; ZHANG, CHENHONG *et al.*, 2010).

Mais recentemente, reconheceu-se que a microbiota responde rapidamente a mudanças de macronutrientes na dieta. Em poucos dias de dieta baseada em produtos animais ou vegetais, verificam-se alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo (TRAN *et al.*, 2019).

Nutrientes e fibras alimentares consumidos pelo hospedeiro são assimilados pelas bactérias intestinais e convertidos a outros metabólitos, capazes de induzir alterações na composição da microbiota. Também os prebióticos – definidos como ingrediente alimentar não digerível fermentável – podem induzir a proliferação de bactérias benéficas, principalmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (SONG, YE *et al.*, 2015). Estudos experimentais indicaram que a suplementação com prebióticos, buscando aumentar seletivamente as *Bifidobacterium*, foi capaz de melhorar a tolerância à glicose e normalizar o processo inflamatório subclínico com redução das concentrações de LPS (CANI; DELZENNE, 2011; LARSEN *et al.*, 2010; REIGSTAD *et al.*, 2010).

Cani *et al.* (2008), ao estudarem a relação entre microbiota, integridade epitelial e obesidade, confirmaram que prebióticos eram capazes de reduzir a permeabilidade intestinal, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a resistência à insulina de ratos obesos submetidos à dieta hiperlipídica. Existe

expectativa de que uma bactéria em particular, a *Akkermansia muciniphila* que degrada mucina, possa ter efeito probiótico. Demonstrou-se, em animais de experimentação, que esta bactéria melhorou a permeabilidade intestinal por aumentar a espessura da camada de muco da mucosa intestinal, reduzindo a endotoxemia metabólica (WATANABE et al., 2018; DE ALMADA et al., 2015; EVERARD et al., 2013).

Existem dúvidas a respeito de quais hábitos alimentares, por quanto tempo e por quais mecanismos modulariam a microbiota intestinal. É provável que modificações nos hábitos alimentares e consumo de probióticos possam favorecer a homeostase intestinal, auxiliando no tratamento de DCNT por meio da manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal.

2 HIPÓTESE

O consumo de probióticos durante a gestação melhora os parâmetros metabólicos em camundongos expostos à dieta hipercalórica rica em frutose e gordura saturada, assim como na prole.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos nas mães e na prole do consumo de probióticos durante a gestação por mães expostas à dieta hipercalórica rica em frutose e gordura saturada.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência da dieta hipercalórica acrescida de frutose na indução de alterações metabólicas em fêmeas e na prole, comparado ao grupo dieta controle acrescidos ou não de probióticos.
- Comparar o ganho de peso corporal, consumo alimentar e alterações na composição corporal.
- Avaliar o metabolismo glicêmico e lipídico, além do perfil inflamatório.
- Qualificar as alterações estruturais do fígado.
- Verificar alterações estruturais do intestino e tecidos adiposos perigonadal e retroperitoneal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA/UFJF), sob protocolo 025/2018. O estudo foi realizado no Biotério de Experimentação Animal do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, registrado com o número 02.0048.2019 de CIAEP (Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa) e as análises foram realizadas nos laboratórios do CBR.

4.1 Animais

Foram utilizados 48 camundongos fêmeas C57Bl/6, fornecidos pelo Biotério de Produção do CBR, também registrado com o mesmo CIAEP. Os animais foram mantidos em prateleiras climatizadas ALESCO®, com fluxo de ar e em condições laboratoriais padrão, com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12h. O ambiente de manutenção dos animais seguiu as recomendações das resoluções normativas 15 (CONCEA, 2013a) e 30 (CONCEA, 2016) do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Entre os 21º e 28º dia pós-natal, os animais foram distribuídos em dois grupos: Dieta controle (C: 24 animais) e Dieta hipercalórica (HC: 24 animais).

4.2 Composição das dietas

O grupo dieta controle (C) recebeu a ração normocalórica da marca Nuvilab CR-1 autoclavável, da empresa Quimtia® (Curitiba - PR, Brasil). Os carboidratos dessa dieta, eram compostos, em sua maior parte, por milho integral moído e farelos de soja e trigo. O grupo dieta hipercalórica (HC) recebeu a dieta da marca PragSoluções Comércio e Serviços Ltda® (Jaú - SP, Brasil), rica em frutose e gordura saturada. A fonte proteica da dieta HC foi a caseína e na dieta C o carbonato de cálcio (Tabela 1). Os animais receberam água filtrada e ração *ad libitum*.

Figura 5 – Dieta HC fornecida aos animais da geração F0. HC – Dieta hipercalórica, composta por ração hipercalórica com 5,98kcal/kg - PragSoluções Comércio e Serviços Ltda® (Jaú - SP, Brasil).

Tabela 1: Composição das dietas experimentais por 100 g.

Ingredientes	C ^A	HC ^B
Carboidrato (%)	56,0	22
Frutose	0	1,0
Sacarose	0	5,0
Outros compostos	56,0	16,0
Proteína (%)	19,0	16
Lipídios (%)	3,5	45
Óleo de soja	3,5	10,0
Banha	0	35,0
Fibra (%)	5,0	12,0
Celulose	5,0	12,0
Mix mineral (%)	3,5	3,5
Mix vitamínico (%)	1,0	1,0
Calorias por 100g de dieta:		
Carboidrato (%)	56,0	22,0
Proteína (%)	19,0	16,3
Lipídios (%)	3,5	45,0
Densidade calórica (kcal/g):	3,86	5,98

A: dieta padrão para roedores B: dieta hipercalórica

Fonte: dados fornecidos pelos fabricantes das rações.

4.3 Probiótico

Confirmada a prenhez por meio da visualização do tampão vaginal pela manhã, a oferta do probiótico iniciou-se no mesmo dia. Para maior controle estabeleceu-se o horário de 14 horas para a oferta de maneira que todos os animais recebessem diariamente no mesmo horário. Ao parto suspendia-se a oferta do probiótico a partir daquele dia.

O produto Biorich® foi oferecido aos animais prenhes dos grupos dieta controle que recebeu probiótico (CGP) e dieta hipercalórica que recebeu probiótico (HCGP) durante o período gestacional (21 dias), via gavagem, no volume de 0,5ml em uma única dose, na concentração de 1×10^6 UFC de cada cepa bacteriana de maneira que a quantidade de bactérias presentes assegurassem sua chegada ao intestino delgado e promovesse a modulação da microbiota intestinal (SAAD, SUSNA MATA ISAY, 2006). Os respectivos grupos controles não tratados com probióticos foram gavados com água filtrada no mesmo volume.

4.3.1 Teste de viabilidade Bio-rich®

O teste de viabilidade do produto foi realizado no Laboratório de Bioatividade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) entre Dezembro e Fevereiro de 2018, correspondente ao período anterior ao início do experimento, como descrito a seguir:

Dia 1: Ativação do inóculo

Suspendeu-se em 100 mL em água destilada estéril (autoclave = 121°C 15min) da cultura liofilizada de Biorich®. Para contagem total de bactérias lácticas utilizou-se ágar MRS.

As análises microbiológicas foram realizadas pela técnica de *Drop-plate* (plaqueamento em gotas). A partir do inóculo (meio de cultura MRS contendo as cepas bacterianas) alíquotas de 10 µl foram inoculadas em quadrantes (4) da placa de Petri contendo o meio de cultura. Posteriormente as placas foram incubadas (incubação a 37°C/48 horas) em estufa e mantidas em anaerobiose. As contagens foram descritas em Log UFC/mL.

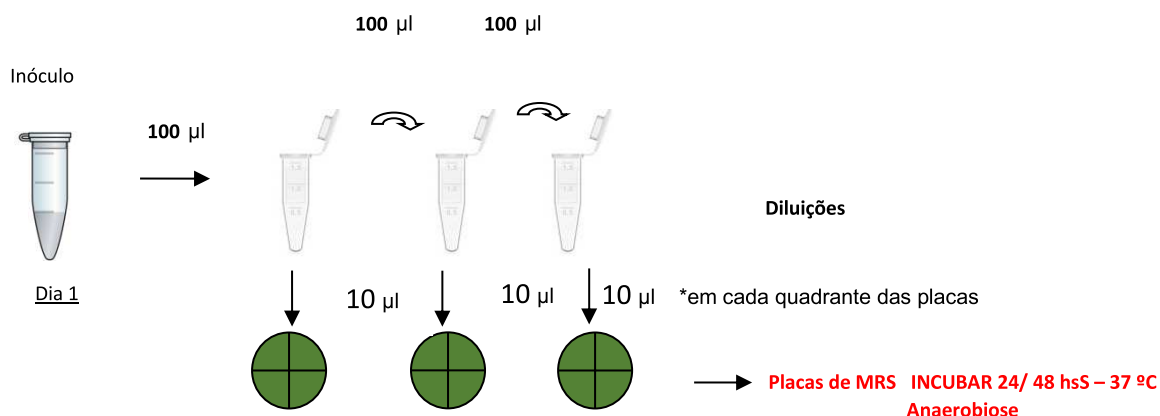


Figura 6 – Processo que descreve o teste de viabilidade das culturas por 7 dias após reconstituição sob refrigeração.

Quadro 1 – Repetição média de três testes para cada diluição

	Sachê 1	Sachê 1	Sachê 1	Sachê 1	Sachê 1	Sachê 1
R E P E T I Ç Õ E S	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS
	10- 1	10- 1	10- 1	10- 1	10- 1	10- 1
	30 UFC	32 UFC	34 UFC	30 UFC	35 UFC	34 UFC
	28 UFC	30 UFC	30 UFC	29 UFC	29 UFC	29 UFC
	29 UFC	31 UFC	27 UFC	32 UFC	30 UFC	30 UFC
	30 UFC	29 UFC	32 UFC	31 UFC	31 UFC	31 UFC
	29 UFC	30 UFC	31 UFC	30 UFC	30 UFC	31 UFC
	32 UFC	31 UFC	31 UFC	28 UFC	28 UFC	30 UFC

4.4 Delineamento experimental

Para a obtenção da geração F1, ao desmame (21-28 dias de nascimento) 48 camundongos fêmeas C57Bl/6, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: dieta controle (C) e dieta Hipercalórica (HC) mantido por 120 dias (PARK *et al.*, 1999) (figura 3).

4.4.1 Obtenção da geração F1

Após 120 dias de vida, as fêmeas da geração F0 (n=48), foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada na proporção de 3:1. Às 7:00 horas da manhã seguinte, o acasalamento foi comprovado pela presença de tampão vaginal. A partir da confirmação da prenhez, os grupos foram divididos em quatro grupos de fêmeas prenhes: CG (dieta controle), HCG (dieta hipercalórica), CGP (dieta controle e probiótico) e HCGP (dieta hipercalórica e probiótico). Os grupos foram mantidos com as dietas correspondentes até o final da lactação. Foram mantidos dois grupos não prenhes: dieta controle (C) e dieta hipercalórica (HC). Próximo à data provável do parto (21º dia pós-inseminação) as fêmeas foram alocadas em caixas individuais para a construção do ninho e parir a ninhada que formou a próxima geração (F1). Do nascimento à vida adulta, a prole foi mantida em dieta controle e eutanasiada aos 60 dias (figura 3).

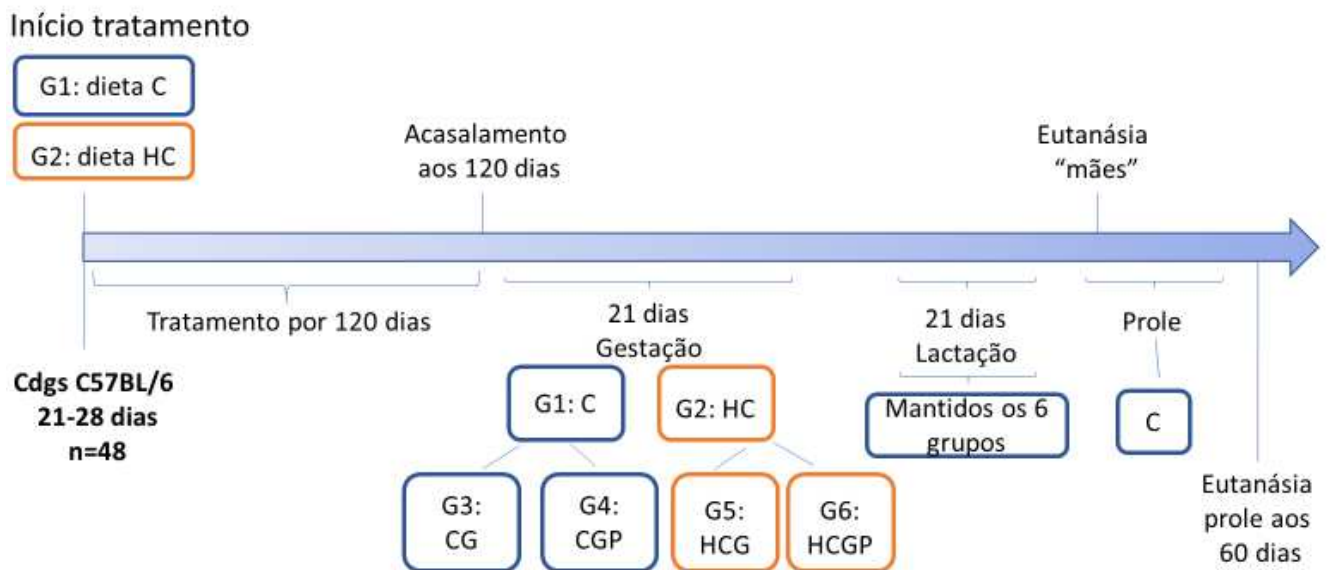


Figura 3 – Delineamento experimental. G1:C (grupo: 1 dieta controle); G2:HC (grupo 2: dieta hipercalórica); G3:CG (grupo três: dieta controle e gestacção); G4:CGP (grupo 4: dieta controle, gestação e probiótico); G5:HCG (grupo cinco: dieta hipercalórica e gestação); G6:HCGP (grupo seis: dieta hipercalórica, gestação e probiótico).

4.5 Dados biométricos

O peso corporal dos animais HC e C foi registrado semanalmente a partir do sétimo dia pós-natal até o dia da eutanásia. O índice de Lee, obtido na eutanásia para avaliação de obesidade, foi calculado pela fórmula $[IL = (MC \times 1/3) / CNA \times 100]$, onde MC = massa corporal (g); CNA= comprimento nasoanal (CNA) (cm). Foram considerados obesos os animais com índice de Lee acima de 0,3. O consumo alimentar também foi obtido semanalmente pela diferença entre a quantidade de alimento ofertada e a remanescente 24 horas após o fornecimento. O índice hepatossomático foi calculado pela relação entre o peso do fígado e a massa corpórea multiplicado por 100 (NOVELLI *et al.*, 2007). A estimativa de acúmulo de tecido adiposo foi realizada pelo peso (g) dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal após necropsia. Essa identificação foi realizada após dissecação dos órgãos abdominais e das gorduras, as quais foram pesadas em balanças de precisão Ohaus - modelo Adventure Pro® (São Bernardo do Campo, Brasil).

4.6 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Duas semanas antes da eutanásia, os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O método consiste em manter os animais em jejum alimentar de 6 horas e obter o sangue por meio de secção da ponta da cauda, por lancetamento com uso de lâmina de bisturi, para aferição de glicemia capilar no T0 (tempo zero). Em seguida, foi administrado 2 g/kg de peso corporal de solução de glicose a 50% aos animais, por via intragástrica (gavagem), e coletadas amostras de sangue nos tempos T1 (15 minutos), T2 (30 minutos), T3 (60 minutos) e T4 (120 minutos) (SILVA *et al.*, 2015). As aferições de glicose capilar subsequentes foram realizadas nos tempos determinados, após a administração de glicose, pela via intragástrica. Todas as amostras foram analisadas em glicosímetro Accu-Check® modelo Active (Roche - Alemanha). A avaliação da tolerância à glicose foi aferida pela área sob a curva que foi calculada utilizando-se o programa Graphpad Prism® – Versão 5 (La Jolla, Estados Unidos). Para a realização de ambos os testes, os animais foram submetidos ao jejum alimentar no período de seis horas.

4.7 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Para o TTI, uma semana antes da eutanásia, os animais foram submetidos ao jejum alimentar de 6 horas prévio ao teste e, então, tiveram novamente a glicose aferida por meio de sangue coletado a partir da ponta da cauda. Os animais receberam dose de insulina do tipo NPH Novolin – Novo Nordisk® (Bagsvaerd, Dinamarca) por via intraperitoneal na dose de 1 UI/kg de peso. As medidas subsequentes de glicose foram realizadas no T1 (5 minutos), T2 (15 minutos), T3 (30 minutos) e T4 (45 minutos) (HIRATA *et al.*, 2003). Os tempos necessários para coleta foram contados a partir da administração intraperitoneal da solução de insulina. Todas as amostras foram analisadas em glicosímetro Accu-Check - modelo Active da marca Roche® (Roche - Alemanha). A avaliação da sensibilidade à insulina foi feita pela determinação da constante de decaimento de glicose/minuto (KTTI), que estabelece a redução da glicemia capilar em porcentagem por minuto. Para isto, foi utilizado o programa Graphpad Prism® – Versão 5 (La Jolla, Estados Unidos).

4.8 Determinação do Coeficiente de Eficiência Energética (CEE)

Afim de determinar a conversão do aporte calórico em aumento de peso dos animais, foi calculado o coeficiente de eficiência energética (CEE) tomando-se como base as fórmulas matemáticas utilizadas segundo (PINHEIRO, 2011):

$$CEE = (PCF - PCI) / ACT$$

Sendo:

PCF – Peso corporal final (g)

PCI – Peso corporal inicial (g)

ACT – Aporte calórico total (gramas)

4.9 Eutanásia

A eutanásia dos animais seguiu as recomendações das resoluções normativas 37 (CONCEA, 2018) do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Os animais foram eutanasiados por exsanguinação cardíaca após anestesia e complementada pela ruptura diafragmática (CONCEA, 2018). O protocolo anestésico utilizado foi a combinação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina na dose de 90 mg/kg (Vetanarcol®, Konig – Brasil) e o sedativo e miorelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg (Kensol®, Konig – Brasil e corrigido na dose para camundongo. Os dois fármacos foram misturados e aplicados unicamente pela via intraperitoneal (WOLFENSOHN; LLOYD, 1995). Após exsanguinação total por punção cardíaca sob anestesia geral, o sangue coletado foi centrifugado e o soro armazenado a -80°C para análises futuras. Imediatamente após a eutanásia, o tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, fígado e intestino delgado foram retirados e pesados em balança de precisão (Bioprecisa®- especificidade 0,0001g - Brasil) e colocados em formol cálcio de Baker. As fezes do reto e cólon foram coletadas no momento da eutanásia em recipiente estéril e congeladas a -80°C.

4.10 Análise bioquímica sérica

A análise bioquímica foi realizada no aparelho automatizado CobaS c111 (Roche®) e kits Cobas c111 para a dosagem de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, glicose, ALT, ácido úrico e creatinina.

4.11 Histomorfometria e histopatologia

4.11.1 Tecido hepático e adiposo

O lobo menor do fígado, tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal totais, foram fixados em formol cálcio de Baker para posterior processamento

histológico, em que os órgãos foram desidratados por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%), diafanizados por xilol, e impregnados em paraplast fundido à temperatura de 56°C a 58°C, usando-se três banhos a fim de retirar os vestígios do diafanizador que prejudicaria a qualidade do bloco, bem como a perfeição dos cortes (TOLOSA, 2003). Os blocos foram cortados em micrótomo de rotação Microm® (Alemanha) obtendo-se cortes de cinco micrômetros (5µm). As lâminas de fígado e tecido adiposo foram coradas por Hematoxilina e Eosina (H.E) para análise histomorfológica. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital. As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do *Software Image J*.

Por meio das fotomicrografias do fígado foram realizadas as análises qualitativas do tecido através da presença de hepatócitos com esteatose microvesicular e esteatose macrovesicular (ABREU, 2013).

No tecido adiposo, a análise quantitativa foi realizada por meio de três medidas: a área, o diâmetro e o perímetro dos adipócitos. A área do círculo é diretamente proporcional ao raio, que é a distância entre o centro e a sua extremidade. Para calcular a área, utilizou-se a expressão $A = \pi * r^2$, onde: $\pi = 3,14$ (aproximadamente) e $r =$ raio. O cálculo do perímetro foi realizado por meio da soma dos comprimentos de todos os lados, pela expressão $C = 2 * \pi * r$, onde: $C =$ raio da circunferência (medida do centro à extremidade). Para o cálculo do diâmetro baseou-se na medida do raio, multiplicado por 2. O cálculo da área, do diâmetro e do perímetro dos adipócitos foi dado pelo valor médio de 100 adipócitos por animal. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 20X e as medidas de diâmetro, perímetro e área dos adipócitos foram obtidas com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics) (ARBEX *et al.*, 2018).

4.11.2 Intestino

O íleo dos animais de cada grupo foi lavado com solução de NaCl 0,9%, preenchido e imerso em solução fixadora de formol cálcio de Baker a 10% por 48 horas. Posteriormente, o íleo foi submetido à rotina de processamento

histológico para confecção de cortes de cinco micrômetros (5 μ m), os quais foram corados por Hematoxilina e Eosina (H.E).

As lâminas coradas com HE do intestino delgado foram escaneadas usando o scanner digital NanoZoomer-XRC12000 (Hamamatsu, Japão). Os parâmetros que descrevem alterações patomorfológicas do intestino delgado (gravidade e extensão do infiltrado inflamatório celular, alterações epiteliais e embotamento das vilosidades, bem como atrofia foram avaliados ao microscópio óptico de acordo com o esquema de pontuação de Erben. A altura e a profundidade das vilosidades da cripta foram medidas manualmente usando o software NDP.view 2 (Hamamatsu, Japão) em 10 locais da seção transversal do intestino em que vilosidades e criptas eram orientadas perpendicularmente à camada muscular. Foram calculados os valores medianos das 10 alturas das vilosidades e das 10 profundidades das criptas, bem como a razão cripta-vilosidade, respectivamente (ERBEN *et al.*, 2014).

4.12 Dosagem de TNF- α e leptina

Os testes enzimáticos por ELISA do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da leptina foram determinados usando kits comercialmente disponíveis (Abcam, Biotech, Life sciences, Cambridge, Reino Unido). Os protocolos do fabricante foram seguidos sempre que kits comerciais foram usados.

4.13 Análise estatística

Inicialmente foi realizado o teste de *Shapiro Wilk* para verificar a normalidade dos dados. Para dados paramétricos foi utilizado o teste t de Student. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Os resultados são expressos como média \pm DP (desvio padrão) e nível de significância adotado $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism[®] 5.0 (San Diego, EUA).

5 Resultados e discussão

Os resultados e discussão são apresentados na forma de dois artigos submetidos em periódico conforme demonstrado no Apêndice.

6 Comentários gerais

A dieta hipercalórica utilizada no projeto se diferenciou das mais comumente utilizadas em experimentação por ser considerada do tipo “High-Fat-High-Sugar”, ou seja, rica sacarose, frutose e gordura saturada. De modo geral as dietas hipercalóricas, apresentam apenas um componente nutricional em excesso, sendo hiperlipídicas ou hiperglicídicas. Porém, para se aproximar do padrão alimentar ocidental atual a dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada foi escolhida.

Pode-se evidenciar que a dieta em gestantes promoveu dislipidemia, maior adiposidade, maior coeficiente de eficiência energética, maior área sob a curva para o Teste de Tolerância à Glicose e menor taxa de decaimento da insulina para o Teste de Tolerância à Insulina, além de valores superiores de leptina e de TNF α . O grupo gestante que recebeu dieta hipercalórica apresentou lipidose hepática moderada a grave, porém quando suplementado com probiótico, o tecido hepático foi compatível com o do grupo controle, ou seja, sem gotículas de gordura.

Os camundongos descendentes das gerações F1, em que as mães foram expostas à dieta hipercalórica apresentaram ganho de peso e alta adiposidade até a idade adulta, embora todos os filhotes fossem alimentados com ração padrão após o desmame. O aumento do peso corporal final, massa de tecido adiposo e glicose descendente do grupo gestante que recebeu dieta HC, indica que a dieta experimental foi capaz de produzir características obesogênicas na prole. De outro modo, o grupo gestante que recebeu dieta hipercalórica quando suplementado com probióticos diminuiu a adiposidade e o peso relativo do fígado na geração F1 tanto em machos quanto em fêmeas.

Embora não tenham sido evidenciadas alterações adicionais, ressalta-se que a observação dos animais da geração F1 contemplou somente até a fase adulta jovem, sendo que, comumente, os distúrbios metabólicos tendem a surgir de forma mais tardia. Dessa forma, estudos que acompanhem por um período de tempo maior podem nos mostrar a transmissão epigenética para a prole a longo prazo.

7 Conclusão

Sendo assim, como conclusões ao trabalho avaliado tem-se que a dieta uma dieta hipercalórica rica em gordura saturada e carboidrato simples foi eficiente em promover resistência à insulina, intolerância à glicose e altos valores de TNF α levando a um maior coeficiente de eficiência energética, por sua vez refletido no aumento da adiposidade em camundongos gestantes. Porém o grupo HC gestante suplementado com probiótico apresentou médias menores para o índice hepatossomático e peso relativo do fígado e nenhuma diferença para ALT em relação ao seu respectivo grupo controle. A análise histomorfológica do fígado deste grupo atingiu o mesmo padrão do grupo tratado com dieta controle. Na respectiva geração F1 houve diminuição da adiposidade e o peso relativo do fígado na geração tanto em machos quanto em fêmeas, e aumento nos níveis de colesterol HDL nos machos. Esses achados mostram que o consumo de probióticos durante a gravidez e lactação pode desempenhar um papel protetor no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) nas mães e promover melhora dos parâmetros metabólicos dos animais da geração F1 de camundongos C57Bl/6.

8 REFERÊNCIAS

ABALOVICH, Marcos *et al.* Y Metabolismo. **Rev Argent Endocrinol Metab** v. 53, n. 1, p. 5–15 , 2016.

ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO. **4.ed. - São Paulo, SP.** p. 1–188 , 2016.

ABREU, ISABEL CRISTINA MALLOSTO EMERICH DE. Esteatose Hepática Em Ratas Hipercolesterolêmicas E O Envolvimento Do Estresse Oxidativo . p. 62 , 2013.

AIKEN, Catherine E.; OZANNE, Susan E. Transgenerational developmental programming. **Human Reproduction Update** v. 20, n. 1, p. 63–75 , 2014.

AMAR, Jacques *et al.* Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. **Am J Clin Nutr** v. 87, n. 5, p. 1219–1223 , 2008.

ARBEX, P.M. *et al.* Extruded sorghum flour (*Sorghum bicolor* L.) modulate adiposity and inflammation in high fat diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods** v. 42 , 2018.

ARNER, Peter; RYDÉN, Mikael. Fatty acids, obesity and insulin resistance. **Obesity Facts** v. 8, n. 2, p. 147–155 , 24 abr. 2015.

BÄCKHED, Fredrik *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 101, n. 44, p. 15718–15723 , 2004.

BARREIROS. Frutose em humanos : efeitos metabólicos , utilização clínica e erros inatos associados Fructose in humans : metabolic effects , clinical. v. 18, n. 3, p. 377–389 , 2005.

BARZ, Mélanie Le *et al.* Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. p. 291–303 , 2015.

BERRY, Daniel C.; JIANG, Yuwei; GRAFF, Jonathan M. Emerging Roles of Adipose Progenitor Cells in Tissue Development, Homeostasis, Expansion and

Thermogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v. 27, n. 8, p. 574–585, 2016.

BISCHOFF, Stephan C. *et al.* Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology** v. 14, n. 1, p. 1–25 , 2014.

BÓDIS, Kálmán; RODEN, Michael. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **European Journal of Clinical Investigation** v. 48, n. 11 , 2018.

BRADLEY, Richard L. *et al.* Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism** v. 295, n. 3, p. 586–594 , 2008.

BRASIL. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA – DBCA Brasília / DF – 2016. **Ministerio Da Ciencia, Tecnologia E Inovação** v. 23, n. 1, p. 3 , 2016.

BRAZ, Marici *et al.* Added sugar intake by adolescents: A population-based study. **Ciencia e Saude Coletiva** v. 24, n. 9, p. 3237–3246 , 2019.

BRUN, Paola *et al.* Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** v. 292, p. 518–525 , 2007.0193-1857.

BUTEL, M.-J.; WALIGORA-DUPRIET, A.-J.; WYDAU-DEMATTEIS, S. The developing gut microbiota and its consequences for health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** v. 9, n. 6, p. 590–597 , 2018.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Medecine et Maladies Infectieuses** v. 44, n. 1, p. 1–8 , 2014.

CANI, Patrice D.; DELZENNE, Nathalie M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology** v. 9, n. 6, p. 737–743 , 2009.

CANI, Patrice D.; DELZENNE, Nathalie M. The gut microbiome as therapeutic target. **Pharmacology and Therapeutics** v. 130, n. 2, p. 202–212 , 2011.

CANI, Patrice D.; EVERARD, Amandine. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. **Molecular Nutrition and Food Research** v. 60, n. 1, p. 58–66 , 2016.

CANI, Patrice D *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic diet–induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes** v. 57, n. 6, p. 1470–81 , 2008.

CASTRO, Gabriela S. F. *et al.* Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cirurgica Brasileira** v. 26, n. suppl 2, p. 45–50 , 2011.

CAWTHORN, William P; SETHI, Jaswinder K. Europe PMC Funders Group TNF- α and adipocyte biology. **Federation of European Biochemical Societies** v. 582, n. 1, p. 117–131 , 2015.

CHATTERJEE, Suparna *et al.* Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentric Trial on Efficacy and Safety of Lactobacillus acidophilus LA-5® and Bifidobacterium BB-12® for Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhoea. **Journal of Association of Physicians of India** v. 61, n. OCT, p. 708–712 , 2013.

CHEN, Xian *et al.* Microbiome, autoimmunity, allergy, and helminth infection: The importance of the pregnancy period. **American Journal of Reproductive Immunology** v. 78, n. 2 , 2017.

CHONDRONIKOLA, Maria; SIDOSSIS, Labros S. Brown and beige fat: From molecules to physiology. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids** v. 1864, n. 1, p. 91–103 , 2019.

CLAYTON, Zoe E. *et al.* Early life exposure to fructose alters maternal, fetal and neonatal hepatic gene expression and leads to sex-dependent changes in lipid metabolism in rat offspring. **PLoS ONE** v. 10, n. 11, p. 1–28 , 2015.

COATE, Katie C. *et al.* Hepatic glucose metabolism in late pregnancy normal versus high-fat and -fructose diet. **Diabetes** v. 62, n. 3, p. 753–761 , 2013.

CODELLA, Roberto; LUZI, Livio; TERRUZZI, Ileana. Exercise has the guts:

How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Digestive and Liver Disease** v. 50, n. 4, p. 331–341 , 2018.

COTILLARD, Aurélie *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature** v. 500, n. 7464, p. 585–588 , 2013.

DAY, C. P.; JAMES, O. F.W. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? **Gastroenterology** v. 114, n. 4 I, p. 842–845 , 1998.

DE ALMADA, Carine Nunes *et al.* Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 99, n. 10, p. 4175–4199 , 2015.

DE VRESE, Michael *et al.* Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. **Journal of Dairy Research** v. 78, n. 4, p. 396–403 , 2011.

DELZENNE, Nathalie M.; NEYRINCK, Audrey M.; CANI, Patrice D. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? **British Journal of Nutrition** v. 109, n. SUPPL. 2, p. 81–85 , 2013.

DIAS, Gisele Cristina; SILVA, Ana Paula. Dias et al. Teores de Lipídios em Refeições.... p. 163–175 , 2011.

DING, Shengli *et al.* High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **PLoS ONE** v. 5, n. 8 , 2010.

DONKIN, Ida; BARRÈS, Romain. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. **Molecular Metabolism** v. 14, n. February, p. 1–11 , 2018.

DUNN, Gregory A.; BALE, Tracy L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology** v. 150, n. 11, p. 4999–5009 , 2009.

EREJUWA, Omotayo O.; SULAIMAN, Siti A.; AB WAHAB, Mohd S. Modulation of gut microbiota in the management of metabolic disorders: The prospects and challenges. **International Journal of Molecular Sciences** v. 15, n. 3, p. 4158–4188 , 2014.

ESTES, Chris *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. **Journal of Hepatology** v. 69, n. 4, p. 896–904 , 2018.

EVERARD, A. *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 110, n. 22, p. 9066–9071 , 2013.

FEDEWA, AMY; RAO, Satish. NIH Public Access. **Curr Gastroenterol Rep** v. 16, n. 1, p. 1–13 , 2015.

FESTI, Davide *et al.* Gut microbiota and metabolic syndrome. v. 20, n. 43, p. 16079–16094 , 2014.

FJELDBORG, Karen *et al.* Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. **Journal of Immunology Research** v. 2014 , 2014.

GAZIOGLU, Sema Bilgic *et al.* PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology** v. 8, n. 12, p. 15919–15925 , 2015.

GHANIM, H.; SIA, C. L.; UPADHYAY, Manish. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 93, n. 3, p. 674 , 2011.

GIBSON, Glenn R.; FULLER, Roy. Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use. **The Journal of Nutrition** v. 130, n. 2, p. 391S-395S , 2000.

GREGOR, Margaret F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory Mechanisms

in Obesity. **Annual Review of Immunology** v. 29, n. 1, p. 415–445 , 2011.

GUARNER, Francisco *et al.* Probióticos e prebióticos, 2017.

HARDER, Thomas *et al.* Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. **American Journal of Epidemiology** v. 165, n. 8, p. 849–857 , 2007.

HARDIKAR, Anandwardhan A. *et al.* Multigenerational Undernutrition Increases Susceptibility to Obesity and Diabetes that Is Not Reversed after Dietary Recuperation. **Cell Metabolism** v. 22, n. 2, p. 312–319 , 2015.

HARRIS, Kristina; KASSIS, Amira; CHOU, Chieh J. Is the Gut Microbiota a New Factor Contributing to Obesity and Its Metabolic Disorders ? v. 2012.

HIRATA, Aparecida Emiko *et al.* Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sciences** v. 73, n. 11, p. 1369–1381 , 2003.

HIROSUMI, Jim *et al.* A central, role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature** v. 420, n. 6913, p. 333–336 , 2002.

HOLTRUP, Brandon *et al.* Puberty is an important developmental period for the establishment of adipose tissue mass and metabolic homeostasis. **Adipocyte** v. 6, n. 3, p. 224–233 , 2017.

HOUSTIS, Nicholas; ROSEN, Evan D.; LANDER, Eric S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature** v. 440, n. 7086, p. 944–948 , 2006.

HOWARD, Jane K.; FLIER, Jeffrey S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v. 17, n. 9, p. 365–371 , 2006.

HUTTENHOWER, Curtis *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature** v. 486, n. 7402, p. 207–214 , 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA;

COORDENAÇÃO DE TRABALHO E RENDIMENTO. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil.** [S.l: s.n.], 2011.

INSTALAÇÕES. Rn15 Conceia. **Diário Oficial da União** n. Seção I, p. 23 , 2013.

JEŽEK, Petr; JABŮREK, Martin; PORTER, Richard K. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics** v. 1860, n. 3, p. 259–269 , 2019.

JIALAL, Ishwarlal; DEVARAJ, Sridevi. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation** v. 33, n. 1, p. 1–6 , 2018.

JIANG, X *et al.* Early life factors and type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research** v. 2013, n. Figure 1, p. 485082 , 2013.2314-6745r2314-6753.

JIANG, Yuwei *et al.* Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. **Cell Reports** v. 9, n. 3, p. 1007–1022 , 2014.

JORDAN, Sheila *et al.* Maternal-Child Microbiome: Specimen Collection, Storage, and Implications for Research and Practice. **Nursing Research** v. 66, n. 2, p. 175–183 , 2017.

KIM, Sun Woo *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 431, n. 2, 2013.

KIRCHNER, Séverine *et al.* Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. **Molecular Endocrinology** v. 24, n. 3, p. 526–539 , 2010.

KOETH, Robert A *et al.* HHS Public Access. v. 19, n. 5, p. 576–585 , 2013.

- KOLIADA, Alexander *et al.* Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology** v. 17, n. 1 , 2017.
- LACERDA, Marcelle Sousa; MALHEIROS, Glícia Campanharo; ABREU, Annelise de Oliveira Wilken De. Tecido Adiposo, Uma Nova Visão: As Adipocinas E Seu Papel Endócrino. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos** v. 11, n. 2, p. 25–31 , 2016.
- LAGKOUVARDOS, Ilias *et al.* The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. **Nature Microbiology** v. 1, n. 10, p. 16131 , 2016.
- LANG, Jenna M; EISEN, Jonathan A; ZIVKOVIC, Angela M. The microbes we eat : abundance and taxonomy of microbes consumed in a day ' s worth of meals for three diet types. p. 1–39 , 2014.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research** v. 61, n. 3, p. 219–225, 2010.
- LARSEN, Nadja *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. v. 5, n. 2 , 2010.
- LAUGERETTE, Fabienne *et al.* Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. **Molecular Nutrition and Food Research** v. 58, n. 7, p. 1513–1518 , 2014.
- LE CHATELIER, Emmanuelle *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature** v. 500, n. 7464, p. 541–546 , 2013.
- LECOUTRE, Simon *et al.* Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. **Molecular Metabolism** v. 6, n. 8, p. 922–930 , 2017.
- LECOUTRE, Simon *et al.* *Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose*

Tissue Development. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. [S.l.]: Elsevier Inc. , 1 out. 2018

LECOUTRE, Simon; BRETON, Christophe. Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring. **Frontiers in Physiology** v. 6, n. MAY, p. 1–7 , 2015.

LEE, In Seok; SHIN, Gina; CHOUE, Ryowon. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. **Endocrine Journal** v. 57, n. 1, p. 39–50 , 2010.

LEY, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 102, n. 31, p. 11070–11075 , 2005.

LI, Baoguo *et al.* Microbiota Depletion Impairs Thermogenesis of Brown Adipose Tissue and Browning of White Adipose Tissue. **Cell Reports** v. 26, n. 10, p. 2720- 2737.e5 , 5 mar. 2019.

LONG, Min *et al.* HHS Public Access. v. 8, n. 5, p. 444–454 , 2016.

LUNDBERG, Randi *et al.* Microbiota composition of simultaneously colonized mice housed under either a gnotobiotic isolator or individually ventilated cage regime. **Scientific Reports** v. 7, n. November 2016, p. 42245 , 2017.

MADSEN, Lise *et al.* Dietary Proteins, Brown Fat, and Adiposity. **Frontiers in Physiology** v. 9 , 12 dez. 2018.

MANCO, Melania; PUTIGNANI, Lorenza; BOTTAZZO, Gian Franco. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. **Endocrine Reviews** v. 31, n. 6, p. 817–844 , 2010.

MASUYAMA, Hisashi *et al.* The effects of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in Adiponectin and Leptin gene expression for multiple generations in female mice. **Endocrinology** v. 156, n. 7, p. 2482–2491 , 2015.

MATFIIIIIIILD, Mark. **Handbook of laboratory animal management and**

welfare. [S.l: s.n.], 1995. 174 p. 16 v.

MCNABNEY, Sean M.; HENAGAN, Tara M. Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: A focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. **Nutrients** v. 9, n. 12, p. 1–28 , 2017.

MELN, Irina *et al.* Dietary calories and lipids synergistically shape adipose tissue cellularity during postnatal growth. **Molecular Metabolism** v. 24, p. 139–148 , 1 jun. 2019.

MIZOCK, Barry A. Probiotics. **Disease-a-Month** v. 61, n. 7, p. 259–290 , 2015.

MONTANARI, T.; POŠĆIĆ, N.; COLITTI, M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity Reviews** v. 18, n. 5, p. 495–513 , 2017.

MOREIRA, Ana Paula Boroni. Influência da dieta na endotoxemia metabólica. **HU Revista** v. 40, n. 3 e 4, p. 203–208 , 2013.

MORRISON, Christopher D. *et al.* Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** v. 1792, n. 5, p. 409–416 , 2009.

MUSSO, Giovanni *et al.* Emerging Liver-Kidney Interactions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Trends in Molecular Medicine** v. 21, n. 10, p. 645–662 , 2015.

NG, Marie *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet** v. 384, n. 9945, p. 766–781 , 2014.

NOGUEIRA, JANAÍNA CÂNDIDA RODRIGUES. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** v. 15, n. 4, p. 487–492 , 2011.

NOVELLI, E. L.B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in

rats. **Laboratory Animals** v. 41, n. 1, p. 111–119 , 2007.

NURIEL-OHAYON, Meital; NEUMAN, Hadar; KOREN, Omry. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. **Frontiers in Microbiology** v. 7, n. JUL, p. 1–13, 2016.

PALHARES, Heloísa Marcelina da Cunha *et al.* Evaluation of clinical and laboratory markers of cardiometabolic risk in overweight and obese children and adolescents. **Clinics** v. 72, n. 1, p. 36–43 , 2017.

PARK, Soyoung *et al.* Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. **Brain Research** v. 847, n. 1, p. 90–97 , 1999.

PARKS, Elizabeth J *et al.* Dietary Sugars Stimulate Fatty Acid Synthesis in Adults. **The Journal of nutrition** v. 138, n. 6, p. 1039–1046 , 2008.

PELZER, Elise *et al.* Review: Maternal health and the placental microbiome. **Placenta** v. 54, p. 30–37 , 2017.

PETERSON, C. T. *et al.* Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. **Clinical and Experimental Immunology** v. 179, n. 3, p. 363–377 , 2015.

PINHEIRO, Isabeli Lins. Murinometric Evaluations and Feed Efficiency in Rats from Reduced Litter During Lactation and Submitted or Not to Swimming Exercise. v. 17, n. 12, p. 49–55 , 2011.

POUTAHIDIS, Theofilos *et al.* Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. **PLoS ONE** v. 8, n. 7 , 2013.

PRINCE, Amanda L. *et al.* The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 214, n. 5, p. 627e1-627e16 , 2016.

QASIM, A. *et al.* On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations.

Obesity Reviews v. 19, n. 2, p. 121–149 , 2018.

RAYMOND, Frédéric *et al.* The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. p. 707–720 , 2016.

REIGSTAD, Christopher S *et al.* The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. n. 392 , 2010.

RIBEIRO, Roberto Marques; RIBEIRO, Roberto Marques. Roberto marques ribeiro. , 2017.

RODRIGO, Silvia *et al.* Maternal fructose induces gender-dependent changes in both LXR α promoter methylation and cholesterol metabolism in progeny. **Journal of Nutritional Biochemistry** v. 61, p. 163–172 , 2018.

SAAD, Antonio F. *et al.* High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 215, n. 3, p. 378.e1-378.e6 , 2016.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 42, n. 1, p. 1–16 , 2006.

SAAVEDRA, Jose M. *et al.* Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 79, n. 2, p. 261–267 , 2004.

SAMPEY, Brante P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. **Obesity** v. 19, n. 6, p. 1109–1117 , 2011.

SARKER, Gitalee *et al.* Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. **Scientific Reports** v. 9, n. 1, p. 1–17 , 2019.

SCHOETTL, Theresa; FISCHER, Ingrid P.; USSAR, Siegfried. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of**

Experimental Biology v. 121 , 2018.

SERINO, Matteo *et al.* Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. **Gut** v. 61, n. 4, p. 543–553 , 2012.

SHEN, Jian; OBIN, Martin S; ZHAO, Liping. Molecular Aspects of Medicine The gut microbiota , obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine** v. 34, n. 1, p. 39–58 , 2013.

SHIBATA, Rei *et al.* Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. **Diabetology and Metabolic Syndrome** v. 4, n. 1, p. 2–5 , 2012.

SILVA, Ana *et al.* Acute and Subchronic Antihyperglycemic Activities of Bowdichia virgilioides Roots in Non Diabetic and Diabetic Rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology** v. 4, n. 1, p. 57 , 2015.

SMITS, Samuel A. *et al.* Individualized Responses of Gut Microbiota to Dietary Intervention Modeled in Humanized Mice. **mSystems** v. 1, n. 5, p. 3–8 , 2016.

SONG, Ye *et al.* Maternal high-fat diet feeding during pregnancy and lactation augments lung inflammation and remodeling in the offspring. **Respiratory Physiology and Neurobiology** v. 207, p. 1–6 , 2015.

SONG, Ziyi; XIAOLI, Alus M.; YANG, Fajun. Regulation and metabolic significance of De Novo lipogenesis in adipose tissues. **Nutrients** v. 10, n. 10, p. 1–22 , 2018.

SPERETTA, Guilherme Fleury; LEITE, Richard Diego; DUARTE, Ana Cláudia De Oliveira. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto** v. 13, n. 1, p. 61–69 , 2014.

SPRUSS, Astrid *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **Hepatology** v. 50, n. 4, p. 1094–1104 , 2009.

TAIRA, Risa *et al.* Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. **J. Clin. Biochem. Nutr** v. 56, n. 2, p. 149–154 , 2015.

TAPPY, Luc; LE, Kim Anne. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological Reviews** v. 90, n. 1, p. 23–46 , 2010.

TAPPY, Luc; MITTENDORFER, Bettina. Fructose toxicity: Is the science ready for public health actions? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** v. 15, n. 4, p. 357–361 , 2012.

TAUQEER, Zujaja; GOMEZ, Gricelda; STANFORD, Fatima Cody. Obesity in Women: Insights for the Clinician. **Journal of Women's Health** v. 27, n. 4, p. 444–457 , 2018.

TEIXEIRA, Tatiana F.S. *et al.* Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutrition Research** v. 32, n. 9, p. 637–647 , 2012.

THOMAS, Linda V.; OCKHUIZEN, Theo; SUZUKI, Kaori. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. **British Journal of Nutrition** v. 112, n. S1, p. S1–S18 , 2014a.

THOMAS, Linda V.; OCKHUIZEN, Theo; SUZUKI, Kaori. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: A symposium report. **British Journal of Nutrition** v. 112, n. SUPPL. 1 , 2014b.

TOLOSA, Erasmo. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. 2. ed. ed. Barueri SP: Editora Manole Ltda, 2003.

TRAN, Hao *et al.* “Western-diet”-induced adipose inflammation requires a complex gut microbiota. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology** , out. 2019.

TREESUKOSOL, Y. *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation reduces the appetitive behavioral component in female offspring tested in a brief-access taste procedure. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 306, n. 7, p. R499–R509 , 2014.

TURNBAUGH, Peter J *et al.* A core gut microbiome between lean and obesity twins. **Nature** v. 457, n. 7228, p. 480–484 , 2009.

- U., Erben *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology** v. 7, n. 8, p. 4557–4576 , 2014.
- UMU, Özgün C.O. *et al.* The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health. **PLoS ONE** v. 11, n. 10, p. 1–22 , 2016.
- VALLE, Camila Piñero; DURCE, Karina; FERREIRA, Claudia Adriana Sant'Anna. Conseqüências fetais da obesidade gestacional. Repercusiones fetales de la obesidad en el embarazo. Fetal repercussions of obesity during pregnancy. **Mundo saúde (Impr.)** v. 32, n. 4, p. 537–541 , 2008.
- VANDENPLAS, Yvan; HUYS, Geert; DAUBE, Georges. Probiotics: An update. **Jornal de Pediatria** v. 91, n. 1, p. 6–21 , 2015.
- VINTURACHE, Angela E. *et al.* Maternal microbiome - A pathway to preterm birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** v. 21, n. 2, p. 94–99 , 2016.1878-0946.
- VOLP, Ana Carolina Pinheiro *et al.* Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2008; 52/3:537-549** v. 52, n. 3, p. 537–549 , 2008.0004-2730.
- WALKER, R. W. *et al.* The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? **Pediatric Obesity** v. 12, n. August, p. 3–17 , 2017.
- WANG, Jingjing *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **ISME Journal** v. 9, n. 1, p. 1–15 , 2015.
- WATANABE, Keita *et al.* Dietary soybean protein ameliorates high-fat diet-induced obesity by modifying the gut microbiota-dependent biotransformation of bile acids. **PLoS ONE** v. 13, n. 8, p. 1–15 , 2018.
- WEITKUNAT, Karolin *et al.* Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. **Molecular Nutrition and Food Research** v. 60, n. 12, p.

2611–2621 , 2016.

WESTERTERP, K. R.; SPEAKMAN, J. R. Physical activity energy expenditure has not declined since the 1980s and matches energy expenditures of wild mammals. **International Journal of Obesity** v. 32, n. 8, p. 1256–1263 , 2008.

WHITE, Pollyanna A. S. *et al.* Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** v. 57, n. 5, p. 339–345 , 2013.

WIKOFF, William R. *et al.* Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 106, n. 10, p. 3698–3703 , 2009.

WILDER-SMITH, Clive H. *et al.* Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. **United European Gastroenterology Journal** v. 2, n. 1, p. 14–21 , 2014.

WU, Chien Chen *et al.* Effect of lactobacillus plantarum strain K21 on high-fat diet-fed obese mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine** v. 2015 , 2015.

WU, Gary D *et al.* NIH Public Access. v. 334, n. 6052, p. 105–108 , 2012.

WU, Gary D *et al.* Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. p. 15–19 , 2010.

YIU, Jensen H.C.; DORWEILER, Bernhard; WOO, Connie W. *Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism* .**Journal of Molecular Medicine**. [S.l.]: Springer Verlag. , 1 jan. 2017

YUE, Shi-Jun *et al.* Berberine alleviates insulin resistance by reducing peripheral branched-chain amino acids. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 316, p. 73–85 , 2019.

ZHANG, Chenhong *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME Journal** v. 4, n. 2, p. 232–241 , 2010.

ZHANG, Chenhong *et al.* Interactions between gut microbiota , host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME Journal** n. October , 2009.

ZHANG, Dong Mei; JIAO, Rui Qing; KONG, Ling Dong. High dietary fructose: Direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. **Nutrients** v. 9, n. 4 , 2017.

ZHANG, Zhi Yun *et al.* Supplementation of the maternal diet during pregnancy with chocolate and fructose interacts with the high-fat diet of the young to facilitate the onset of metabolic disorders in rat offspring. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v. 40, n. 9, p. 652–661 , 2013.

ANEXO 1

Certificado de aprovação da solicitação de uso de animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA-UFJF) para o presente projeto de pesquisa.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/06/2018, analisou o protocolo nº. 025/2018 intitulado "Alteração do metabolismo de camundongos C57Bl/6 através da modulação da microbiota intestinal/ Alteration of the metabolism of C57Bl/6 mice by modulation of the intestinal microbiota", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Vera Maria Peters e colaboração de Priscila Marques Arbex, e Rovilson Gilioli, a ser realizado no período de 30/07/2018 a 30/03/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 170 Camundongo isogênicos C57Bl/6 (32 fêmeas de 21-28 dias, 10 machos de 120 dias e 128 filhotes machos e fêmeas), projeto a ser realizado no biotério Localizado no Centro de Biologia da Reprodução (CBR) no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n. 025/2018- CEUA about "Alteração do metabolismo de camundongos C57Bl/6 através da modulação da microbiota intestinal/ Alteration of the metabolism of C57Bl/6 mice by modulation of the intestinal microbiota", under responsibility of Vera maria Peters and collaboration of Priscila Marques Arbex, and Rovilson Gilioli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/06/2018. For the development of this research 170 mice of lineage isogenic C57Bl/6 (32 females of 21-28 day of age, 10 males of 120 days of age and 128 males and females pups), will be delivered as requested in the period of 30/07/2018 to 30/03/2021. The Project will be performed at Biology Reproduction Center located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of vality.

Juiz de Fora, 14 de junho de 2018.

Vice-coordenadora
CEUA

Coordenadora
CEUA

ANEXO 2

Comprovação de submissão de artigo em periódico especializado

21/10/2020

Gmail - Journal of Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD-10-20-OA-1469



Priscila Arbex <prisarbex@gmail.com>

Journal of Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD-10-20-OA-1469

Journal of Developmental Origins of Health and Disease

21 de outubro de 2020

<onbehalf@manuscriptcentral.com>

18:21

Responder a: doheditorial@cambridge.org

Para: prisarbex@gmail.com

21-Oct-2020

Dear Prof. Arbex:

Your manuscript entitled "Multigenerational effects of probiotics during pregnancy and in offspring by mothers exposed to a hypercaloric diet" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Your manuscript ID is DOHaD-10-20-OA-1469.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Sincerely,

Journal of Developmental Origins of Health and Disease Editorial Office

=====

Journal of Developmental Origins of Health and Disease (JDOHaD) is indexed in Thomson Reuters Citation Index®. All content from Volume 1 onwards is indexed by ISI, and its 2012 Impact Factor is 1.207. The Journal is additionally indexed by MEDLINE.

To keep up to date with the latest news from JDOHaD register for alerts: <http://journals.cambridge.org/doh-alerts>

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=4948e2eed7&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1681179070894960085&simpl=msg-f%3A1681179...> 1/1

APÊNDICE 1

Title: Multigenerational effects of probiotics during pregnancy and in offspring by mothers exposed to a hypercaloric diet

Short title: Consumption of probiotics by pregnant mice

Priscila Marques Arbex¹, Frauke Seehusen², Ana Paula Lélis Morais¹, Martha de Oliveira Guerra¹, Vera Maria Peters¹

¹ Reproduction Biology Center - Federal University of Juiz de Fora - Brazil

² Institute for Veterinary Pathology, University of Zurich – Switzerland

Abstract

Increased fat and carbohydrate intakes based on the Western diet are important lifestyle modifications that lead to hypercaloric inputs, obesity and negative effects during pregnancy. Recent evidence indicates that there is a relationship between diet, intestinal microbiota and obesity. The present study aims to evaluate the influence of a hypercaloric diet (HC) diet supplied with probiotics to C57Bl/6 mice from weaning until adult life on inflammation and metabolic parameters after pregnancy. The Control groups (C, CP and CPP) received the normocaloric diet - Nuvilab Quimtia® - 3.86 kcal/kg. The Hypercaloric groups (HC, HCP and HCPP) received the HC diet – PragSoluções® – 5.98 kcal/kg. The control pregnant probiotic (CPP) and the hypercaloric pregnant probiotic group (HCPP) received the corresponding diet plus probiotics during pregnancy. Metabolic and biometric parameters, glucose tolerance test (GTT), insulin tolerance test (ITT), inflammation level, morphology assessments and histological analyses of liver, adipose tissue and intestine were performed. An increase in adiposity, leptin, higher energy efficiency coefficient, glucose, lower

insulin decay fate for insulin, change in lipid profile and hepatic lipidosis in F0 were observed, while hepatic tissue from the hypercaloric group with probiotics matched the control group, without fat droplets. Maternal overeating increased health risks both for mother and offspring, demonstrating that a hypercaloric diet intake promotes metabolic alterations in the offspring. Maternal probiotics had an effect in F1 generation, reducing the adiposity, relative liver weight, increasing HDL cholesterol and restoring the integrity of the intestinal barrier.

Keywords: hypercaloric diet, probiotics, pregnancy, mice, metabolism.

Introduction

The westernization of food has led to an increase in the availability of high-calorie and high-fructose foods, such as soft drinks and pre-prepared foods, such as processed and ultra-processed foods, which contribute to the increase in the prevalence of chronic non-communicable diseases (CNCD), such as obesity (1).

Studies in animal and human models demonstrate that maternal overfeeding can confer an increased risk of obesity in the offspring through 'agenetic' transmission commonly referred to as the 'intragenerational cycle of obesity'. Fructose, present in added sugars such as sucrose and high fructose corn syrup, has been linked with obesity and metabolic syndrome (2).

Experimental studies have shown that simple carbohydrates, such as fructose and glucose can induce leptin resistance and virtually all the features of metabolic syndrome, whereas glucose intake does not (3). The precise mechanisms by which exposure to environmental disturbances can influence long-term results are complex and depend on the type, time and severity of exposure (4). A study by Sarker et al. (5) showed that maternal exposure to high-fat diet (HFD) at different stages of preconception, pregnancy and lactation does induce phenotypes related to metabolic disorders. Short-term pre-conception maternal exposure to HFD does not affect the physiology of the children.

Evidence indicates that microbial colonization may begin in utero and that, depending on the type of microbiota, premature births, metabolic, gastrointestinal and allergic disorders are observed (6,7). However, it is still not possible to determine the links between specific microorganisms and comorbidities in pregnancy and offspring. Differences in the intestinal microbiota between lean and obese humans and animals suggests a link between the intestinal microbiota

and the energetic homeostasis, affecting both the acquisition of nutrients and the regulation of acquired energy (8). In obesity, the way the body metabolizes nutrients is an important factor to worsen the pathology, so that the composition of the intestinal microbiota determines the production of lipoproteins lipases and modulates the absorption of lipids (9). Each bacterial population can manipulate nutrient absorption in a specific way (10).

There is a relationship between diet, intestinal microbiota and obesity. The metabolic changes observed have been considered of relevance for the development of new treatment options, mainly by modulating the intestinal microbiota through the consumption of probiotics (11,12). There is growing interest in understanding the relationship between the composition of the intestinal microbiota and metabolic changes, such as the development of obesity, type 2 diabetes mellitus and insulin resistance during pregnancy, including lactation and the effects in offspring (13,14).

Thus, this study aims to evaluate whether maternal overweight can cause metabolic effects in offspring of subsequent generations and if probiotics during pregnancy protects against the development of obesogenic phenotype in adult life.

Methods

Animal source

The animals were obtained from the Reproductive Biology Center (CBR) breeding facilities belonging to the Juiz de Fora Federal University (UFJF), CIAEP n. 01.0048.2013. All experimental procedures were previously approved by the Juiz de Fora Federal University Ethics Committee on Animal Use/CEUA (n. 025/2018).

Freshly weaned female C57Bl/6 mice (n = 48) 21 days old (F0) were used. All animals were maintained in polypropylene cages with four individuals per cage, in ventilated cabinets with controlled airflow, temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and relative air humidity ($60\% \pm 10\%$). The animals had free access to feed and non-sterilized filtered water under a 12:12-h light–dark cycle, from 6am to 6pm.

Experiment outline

F0 generation

Fourty eight female C57Bl/6 mice were randomly distributed into two groups containing 24 animals each, receiving either a standard (C) or hypercaloric (HC) diet, both groups received diet and water *ad libitum*. The C group received the normocaloric (3.86kcal/g) Nuvilab CR-1 feed, manufactured by Quimtia® (Curitiba, Brazil). The HC group received the high palatability hypercaloric (5.98Kcal/g), manufactured by PragSoluções Comércio e Serviços Ltda (Jaú, Brazil). Both groups received the respective diets after weaning until the end of lactation.

Standard and hypercaloric diet feeds

The C group received the normocaloric diet with composition of 56% of carbohydrate, 19% of protein and 3.5% of lipids with a caloric density of 3.86 kcal/kg. The HC group received the high palatability hypercaloric HC, rich in sucrose and lipids, with composition of 22.0% of carbohydrate, 16.3% of protein and 45% of lipids with a caloric density of 5.86 kcal/kg.

F1 generation

When F0 generation females (n = 48) were 120 days of age, they were mated with males of proven fertility in the proportion of 3: 1. At 7:00 am the next morning, the mating was confirmed by the presence of vaginal tampon. From the

confirmation of pregnancy, the groups were divided into four groups: CP (control diet: pregnant mice who did not receive probiotic during pregnancy), HCP (hypercaloric diet: pregnant mice who did not receive probiotic during pregnancy), CPP (control diet: pregnant mice who received probiotic during pregnancy) and HCPP (high calorie diet: pregnant mice who received probiotic during pregnancy).

Near the probable date of delivery, the females were placed in individual boxes to build the nest and give birth. Two days after the delivery, six pups per female were sexed and standardized, comprising three males and three females. After offspring weaning, 21 days after birth, both F1 male and female pups (n = 24) were weighed and distributed into 4 groups of 6 animals each, according to the maternal F0 group to which they belonged to. From weaning to 60 days of age the puppies received a normocaloric diet from Quimtia® (3.86kcal/g) and water *ad libitum*.

The Biorich® product was offered to animals in the pregnant control diet groups that received a probiotic (CGP) and a pregnant high calorie diet that received a probiotic (HCGP) during the gestational period (21 days), via gavage, in the volume of 0.5 ml in a single dose. The concentration of 1×10^6 CFU of each bacterial strain (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* BB12, *Lactobacillus acidophilus*) was chosen to ensure its arrival in the small intestine and promote the modulation of the intestinal microbiota (15). Near the probable date of delivery (21st day after insemination) the females were placed in individual boxes to build the nest and give birth. For greater control, a 14-hour offer time was established so that all animals received daily and at the same time.

Animals in the non-probiotic groups received filtered water. At delivery, the probiotic supply was suspended from that day.

Body weight assessments, caloric intake and Energy Efficiency Coefficient (EEC)

After weaning, the animals were evaluated weekly and data concerning total body weight (g) evolution and estimated one-day food consumption were obtained. The energy efficiency coefficient (EEC) was determined as: $EEC = (FBW-IBW)/TCI$, where EEC (g/cal); FBW - Final body weight (g); IBW - Body weight after weaning; TCI - Total caloric intake (calories) (16). Final weight and nasoanal length (NAL) (cm) were also taken before euthanasia.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Two weeks before mating the animals were submitted to the oral glucose tolerance test (OGTT). Blood samples were obtained by means of tail sectioning by lancing using a scalpel blade as close to the tail tip as possible, in order to measure capillary glucose at T0 (time zero - 6-hour fasting period). Subsequently, an intragastric dose of a 50% glucose solution at 2 g/kg body weight was administered and blood samples were taken at T1, T2, T3 and T4 (15, 30, 60 and 120 minutes) according to Silva et al. (17). All samples were analyzed on an Accu-Check® Active model glucometer (Roche - Germany). The area under the curve using the Graphpad Prism® - Version 5 software (La Jolla, USA).

Insulin tolerance test (ITT)

One week before mating, the animals were submitted to the insulin tolerance test. After a 6-hour fasting period prior to the test glucose was measured by means of blood collected from the tip of the tail. The animals received an NPH Novolin-Novo Nordisk® (Bagsvaerd, Denmark) insulin dose intraperitoneally at 1 IU/kg body weight. Subsequent glucose measurements

were performed at T1, T2, T3 and T4 (5,15, 30 and 45 minutes) from intraperitoneal administration of the insulin solution (18). All samples were analyzed on an Accu-Check® Active model glucometer. The glucose decay coefficient/minute (K_{ITT}), using the Graphpad Prism® - Version 5 software.

Euthanasia

At the end of lactation, after a 6h fasting, the animals were euthanized through total exsanguination under ketamine (90 mg/kg ip.) and xylazine (10 mg/kg ip.) anesthesia (König SA®, Avellaneda, Argentina), followed by diaphragm rupture. Blood was collected by cardiac puncture and blood serum was separated, fractionated in aliquots and stored at -80°C for subsequent biochemical analyses.

Adipose tissue accumulation estimates

Adipose tissue accumulation estimates were performed by weighing (g) retroperitoneal (RFW) and perigonadal adipose (PFW) tissues in animals after dissection of abdominal organs and fat, which were weighed on precision scales.

Serum biochemical evaluations

Serum creatinine (CRE), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol fractions (HDL and LDL), triglyceride (TRIG), glucose (GLU) and uric acid (UA) levels were evaluated using commercial Roche® brand kits on a Cobas analyzer, Model C 111, also from Roche® (Indianapolis, USA).

Organ weights

Necropsies were performed and the following organs removed and weighed on a precision scale: retroperitoneal fat weight (RFW), perigonadal fat weight (PFW) and liver weight (LW).

Histomorphometry and histopathology

Liver

The lesser lobe of the liver, total retroperitoneal and perigonadal adipose tissues, were fixed in Baker's calcium formalin for later histological processing, where the organs were dehydrated by increasing alcohol baths (70%, 80%, 90%, 100%), diaphanized by xylene, and impregnated in molten paraplast at a temperature of 56 ° C to 58 ° C, using three baths in order to remove the traces of the diaphanizer that would impair the quality of the block, as well as the perfection of the cuts (19). The blocks were cut in a Microm® rotation microtome (Germany, obtaining cuts of five micrometers (5µm). The slides of liver and adipose tissue were stained by Hematoxylin and Eosin (HE) for histomorphological analysis. Photomicrographs were obtained in a Leica DM5000 microscope coupled to the digital camera. The morphometric analyzes were performed with the aid of the Image J. Software

Qualitative analyzes of the tissue were performed using liver photomicrographs to evaluate the physiological liver architecture with the Image J Pro-Plus® version 4.5 (Media Cybernetics) (20).

Adipose tissue

In adipose tissue, quantitative analysis was performed using three measures: the area, diameter and perimeter of the adipocytes using Adiposoft® program. The area of the circle is directly proportional to the radius, which is the distance between the center and its end. To calculate the area, the expression $A = \pi * r^2$ was used, where: $\pi = 3.14$ (approximately) and $r =$ radius. The perimeter was calculated by adding the lengths on all sides, using the expression $C = 2 * \pi * r$, where: $C =$ radius of the circumference (measured from the center to the end).

For the calculation of the diameter it was based on the radius measurement, multiplied by 2. The calculation of the area, diameter and perimeter of the adipocytes was given by the average value of 100 adipocytes per animal. The images of the histological sections were captured with a 20X objective and the measures of diameter, perimeter and area of the adipocytes were obtained with the aid of the Image J Pro-Plus® version 4.5 (Media Cybernetics) (21).

Intestine

The ileum of the animals in each group was washed with 0.9% NaCl solution, filled and immersed in 10% Baker formaldehyde fixative solution for 48 hours. Subsequently, the ileum was subjected to a histological processing routine to make cuts of five micrometers (5µm), which were stained with Hematoxylin and Eosin (H.E).

The small intestine HE stained slides were scanned using the digital scanner NanoZoomer-XRC12000® (Hamamatsu, Japan). The parameters that describe pathomorphological changes in the small intestine (severity and extent of the inflammatory cell infiltrate, epithelial changes and dullness of the villi, as well as atrophy) were evaluated under an optical microscope according to the Erben et al. (22) scoring scheme. The height and depth of the villi of the crypt were measured manually using the NDP.view 2 software® (Hamamatsu, Japan) at 10 locations in the intestinal cross section where villi and crypts were oriented perpendicularly to the muscle layer. The median values of the 10 villus heights and 10 depths of crypts as well as the crypt-villus ratio were calculated, respectively (22).

TNF α and Leptin measurement

ELISA enzymatic tests of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF α) and leptin were determined by using commercially available kits (Abcam®, Biotech, Life sciences, Cambridge, UK). The manufacturer's protocols were followed whenever commercial kits were used.

Statistical analyses

Data distributions were analyzed by the Shapiro-Wilk test. Comparisons were performed between the Control groups with their respective Hypercaloric groups. Student's t-test was performed when data presented a normal distribution, while the Mann-Whitney test was used for non-normally distributed data. The adopted level of significance was $p < 0.05$. The Graphpad® software, version 8 (San Diego, California) was used for all statistical analyses.

Results

Maternal evaluation (F0)

Animals from the hypercaloric group (HC) displayed weight gain, increased relative weight of livers, hepatosomatic index, retroperitoneal and perigonadal fat weight and higher levels of leptin when compared to control group (C). OGTT area under the curve was statistically different between C and HC, with a larger area for the HC group. Animals from hypercaloric group presented a significant lower mean insulin decay rate compared to group their control (Fig 1).

The pregnant hypercaloric group (HCP) presented serum alanine amino transferase values significantly higher when compared serum alanine amino transferase compared to their control (CP). Decreased means related to serum

urea concentrations were observed, with a significant difference between the control and hypercaloric groups with probiotics.

Regarding of adipose tissue, increases in the mean of area, perimeter and diameter were observed in the hypercaloric probiotics group in relation to their control. No statistical differences between the observed means for villus and crypt measures of the groups were observed, despite group HCPP having the same means of villus as group C (Table 2). None of the intestines showed more than just mild inflammatory infiltrations. The epithelial cells did not show any signs of necrosis or degeneration from a morphological point of view. The HC group showed mild cytoplasmic vacuolation of fat, featuring mild hepatic lipidosis. The hypercaloric pregnant group (HCP) showed moderate to severe cytoplasmic vacuolation, fat vacuoles of varying sizes, featuring moderate to severe hepatic lipidosis, but when they received probiotics the hypercaloric pregnant group (HCPP) presented mild cytoplasmic glycogen storage, without any sign of fat vacuoles, matching the hepatic tissue of the control group (CPP) (Fig 2).

Offspring evaluation

F1 males

Table 3 results indicate that the hypercaloric diet consumed by the mother led in HCP puppies a body weight increase after weaning (+29.94%), higher relative perigonadal fat weight (+25.02%) and cholesterol level (+7.11%) when compared to control group (CP). In the adipose tissue, we observed an increase in the mean of area (+46.54%), perimeter (+21.09%) and diameter (+24.06%) in the hypercaloric groups in relation to their respective controls. The HCP group presented a decrease in the villus crypt ratio of intestine compared to CP group. Otherwise the hypercaloric group with probiotics (HCPP) group showed a

decrease in the values of relative liver weight (-20.01%) and perigonadal fat weight (-33.33%) and increase in HDL cholesterol (+14.57%) compared to their control (CPP). Serum TNF α and leptin levels were no significant different between the groups, although the HCPP group presented higher means for TNF α and the HCP group for leptin (Fig.3).

F1 females

Comparisons between the CP and HCP groups indicated an increase in final body weight (+7.21%), body weight after weaning (+33.84), relative retroperitoneal fat weight (+75.01%), and relative perigonadal fat weight (+62.5%) and glucose (+18.61%). This groups also showed an increased in the area (+42.39%), perimeter (+17.69%) and diameter (+18.02%) of adipose tissue compared to the CP group. In turn, decreased triglycerides (-21.62%) were observed when comparing HCP with CP. The hypercaloric pregnant group presented a decrease in the means for villus cypt ratio (-32.08%) compared to their control.

When received probiotics, the pregnant group presented lower means for relative liver weight (-20.01%) and perigonadal fat weight (-50.01%). This group also showed lower means for adipose tissue, with significant difference for the perimeter (-9.80%) and the area and diameter matching the CPP group.

Regarding the serum TNF α the hypercaloric groups presented higher means than their respective control groups, but only the HCP differ significantly. For leptin both HC groups showed higher values compared to their respective control group with significant difference (Fig.3).

Discussion

Dietary and probiotics effects on the F0 generation

The results reported in the present study confirm previous findings, indicating that animals exposed to hypercaloric diet tend to display metabolic changes when compared to those on standard diet. This confirms the efficiency of a diet rich in simple carbohydrates such as fructose and glucose, in addition to saturated fat. Epidemiological, clinical and preclinical studies in animals relate excessive intake of refined sugars, such as fructose, sucrose and corn syrup (high fructose concentration) during pregnancy with an increased risk of developing obesity, insulin resistance and diabetes mellitus type 2 in prolongation during adult life (23). Accompanying the increase in adiposity, we can observe an increase in energy efficiency, mainly in groups that received fructose in relation to the control group, showing that there is an increase in energy demand in females during gestation periods when there is excessive consumption of fructose.

The energy efficiency parameter, i.e. the average body weight gain divided by the average energy unit ingested, was also shown to be elevated in mice that received a high carbohydrate diet (28). Therefore, the assessed diet led to a greater conversion of ingested calories to weight gain in the HC group, especially concerning increasing perigonadal and retroperitoneal fat mass, corroborating the findings reported by LeCoutre et al. (29) who studied the development mechanisms of adipose tissue (AT) in rodents, suggesting that hyperplasia and hypertrophy occur in specific ways for sex and deposit area. Instead of what was observed for the pregnant groups, the HC group presented higher body weight than C group, showing the efficiency of the high calorie diet in weight gain and

that pregnancy can play a protective role in weight gain through greater energy demand, as reported by Starling (30) and Loy (31) . However, OGTT and ITT alterations were observed between C and HC groups confirming White et al. (32) who verified higher glycemia and insulin resistance levels in mice fed with hyperlipidic diet during 10 weeks.

Song et al. (33) also described that a high fructose maternal diet showed an exaggerated hyperinsulinemic response to pregnancy, which continues throughout pregnancy. The supplementation with probiotics in the hypercaloric leads to same means of serum concentrations of total cholesterol and its HDL and triglyceride fractions compared to their control group, corroborating the literature, demonstrating that supplementation during pregnancy of different strains from *Lactobacillus* appears to be protective against dyslipidemia (34).

When combined, the probiotic strains *Bifidobacterium bifidum* BB12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Streptococcus thermophilus* can increase the immune response and assist in the recolonization of the intestinal microbiota (35). Corroborating our findings where the evaluation of the damage in ileum showed just mild inflammatory infiltrations in HCPP groups, and it's known that we can find lymphocytes and plasma cells in the mucosa of the small intestine under physiological circumstances. The villus cript ratio from the hypercaloric group with probiotics matched their control group. This group also showed lower hepatosomatic index and relative weight of the liver and no statistically significant difference for alanine amino transferase which is an important marker of liver damage. Corroborating these results, the histomorphological analysis of the liver showed the absence of fat droplets, reaching the same pattern of the group treated with a control diet. These findings show that the consumption of probiotic

may play a protective role in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and can overcome the harmful effects on the intestinal level of a diet rich in fructose and saturated fat.

The group that received a HC diet and probiotics during pregnancy presented higher means of TNF α compared to their respective control, showing that the mechanism of action of probiotics through the intestinal modulation of the immune system may not have been effective in reducing this marker. Corroborating our findings, Ding et al. (42) working with C57Bl/6 observed a higher level of TNF α in mice fed with hypercaloric diet, suggesting an interaction between the diet and the bacteria present in the intestine promoting proinflammatory changes in the small intestine, which precede weight gain and obesity and showing strong and significant associations with progression of obesity and development of insulin resistance.

In our study all groups fed a diet rich in saturated fat and fructose had significantly higher leptin levels compared to their control groups, however, not the highest daily food consumption was observed in the control groups, which may have happened due to the potential sacietogen that the amount of fat present can provide to the animals, corroborating the results found by Arbex (21). The failure of this hyperleptinemia to produce any compensatory decrease in food intake or body weight was initially viewed as evidence of leptin resistance.

Effects on descendants

Maternal obesity induces changes in offspring metabolic status and plays a key role in the probability of onset of metabolic disorders in the offspring through mechanisms that are not clearly understood (44). In the current investigation, maternal HC feeding led to weight gain and high adiposity through adulthood,

even though all the pups were fed with standard chow after weaning. These data highlight the long- term influence of maternal diet on the offspring's metabolism. In a recent report, it has been shown that a high-carbohydrate supplement ingestion during gestation leads to leptin resistance in adult offspring independently of birth weight, and it is known that these hormonal changes characterize obesity-prone animals (46). In fact, Fergusson and Koski (47) concluded that, during pregnancy, it was the quantity rather than quality of carbohydrate that determined fetal and postnatal development.

Concerning the transgenerational metabolic programming model, the results of the present study demonstrate the model efficacy in inducing changes to offspring in future generations. The increased final body weight, adipose tissue mass and glucose in HCP group indicates clearly that the experimental diet was able to produce obesogenic characteristics (31,48), this effect may be due to the greater capacity of the high-calorie diet to convert consumption in grams into weight gain as evidenced by the greater EEC in the male and female hypercaloric groups (49).

According to literature, some mechanistic pathways may explain the greatest evidence of this effect in females, which presented increased body weight, adiposity, relative liver weight and glucose in the group descending from the F0 generation that consumed a HC diet without probiotics (HCP) (32,40,50). In males, we observed an increase in FBW, adiposity, but also the total cholesterol which could be due the increasing in HDL cholesterol. The HC diet offered to mothers led to increased adiposity and body weight in F1 males and females from the HCP generation. In this way, this study thus demonstrates the transgenerational effect of the fructose-and lipid-rich diet prior and during

pregnancy. One of the consequences of hypercaloric, hypolipemic or hyperglycemic diet consumption during pregnancy and lactation is a glycemic profile alteration in adult descendants (45,51). Since it had previously been demonstrated that fructose-fed female, but not male rats, the modulation of pancreatic β -cells may occur, implying in glycemia alterations (2,45). Some studies have suggested that high fat-sugar diet could increase the gut microbial diversity, which is similar to the gut microbiota pattern in type 2 diabetic patients (52).

The influence of maternal obesity during pregnancy on the offspring gut microbiota, which could be transmitted from mother to offspring, may be one of the important factors influencing the metabolism. It is known that the gut microbiota control intestinal permeability, which determines the threshold at which metabolic endotoxemia could induce the metabolic disorders. In this context, we hypothesized that manipulating the maternal gut microbiota through probiotics administration leads to weight loss, reduction adiposity levels and plasma glucose in the offspring.

The precise mechanism by which the microbiota regulates the metabolism is not clear. It was hypothesized that alteration of microbiota composition may stimulate development of obesity via several mechanisms: gut microbiota could affect the gut barrier functions, food intake regulatory signals and energy balance, thus leading to an increase in body weight (62). In this study, the intervention on 21 days of pregnancy reversed the increased adipose tissue mass female offspring at 60 days of life from mothers fed with hypercaloric diet and probiotics (34,63).

Although offspring appear to have early onset changes in metabolic regulation it is unclear whether phenotypic effects in the offspring are the direct effect of fructose transfer through the placenta to the fetus, the effect of fructose transmitted to the neonate during lactation through the mother's milk, or the result of adaptive responses made by the offspring in response to altered maternal metabolism (40,64). Experimental animal models strongly suggest that fructose intake during pregnancy and lactation leads to metabolic dysfunction in both the mother and the newborn. Increased liver weight and glycogen content and elevated plasma glucose and triglycerides may suggest that fructose can promote lipogenesis and induce a state of fatty liver (65), but our results in the groups of males and females from mothers fed with hypercaloric diet showed no more than a moderate glycogen store and physiological liver architecture, without hepatocellular lipidosis. This result leads to two hypotheses: that the maternal diet was not enough to change this parameter in the offspring or that the consumption of a control diet shortly after weaning until adulthood protected the offspring from the harmful effects of the diet.

We assessed the integrity of the intestinal barrier through the ileum and none of the intestines showed more than just mild inflammatory infiltrations. Although we observed a decreased crypt villus ratio in male and female from HCP group, which may point to a possible decrease in barrier integrity and increase in intestinal permeability, as sign of altered epithelial barrier function. However, the same measurements of the group of pups in which the mothers received the probiotics presented, both in males and females, was similar to their respective control. Although the fecal microbiota was not characterized in the present study, the high maternal intake of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus*

acidophilus LA-5 can positively affect the microbial balance (67) leading to an improvement of adiposity, reduced the relative weight of liver and restored the integrity of the intestinal barrier.

Corroborating the literature, leptin resistance was observed in the offspring of males and females of mothers fed a diet rich in sugar and fat, suggesting the transgenerational metabolic effect of maternal obesity (4,68). Our data showed that animals fed with hypercaloric diet and treated with probiotics presented the same final weight gain compared to control counterparts. Despite the decrease in adiposity in the high-calorie diet groups that received probiotics, there was no improvement in leptin levels in females, however when analyzing the males in the same group the mean was equal to their respective control, suggesting that the effects of probiotics on metabolism hormone through modulation of the intestinal microbiota was prevalent in males.

It is well known that overproduction of TNF α by macrophages in adipose tissue is an important feature of obesity (42). TNF α production initiated by bacterial components such as LPS, lipoteichoic acid, and peptidoglycan can lead to the development of systemic inflammatory response syndrome (71). We observed that the levels of TNF α were the same between the control group and the hypercaloric groups which received probiotics during pregnancy, suggesting the interaction of probiotics with lymphoid tissue associated with the gastrointestinal tract (GALT).

Conclusion

A high calorie diet, rich in fat and fructose, was efficient in promoting insulin resistance, glucose intolerance and high TNF α values leading to a higher energy efficiency coefficient, and increased adiposity in pregnant mice. When

supplemented with probiotics the hypercaloric group showed lower means for the hepatosomatic index and relative weight of the liver and no difference for ALT comparing to their respective control group and the histomorphological analysis of the liver reached the same pattern of the group treated with a control diet. These findings show that the consumption of probiotics during pregnancy by mice fed a diet rich in fructose and saturated fat may play a protective role in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Although the harmful effects of a fructose- and lipid-rich diet in individuals of a reproductive age can be transmitted to subsequent generations, the results of the present study suggest that maternal supplementation of probiotics leads to beneficial effects on limiting the impact of hypercaloric maternal diet in metabolic programming offspring, reducing adiposity and the relative weight of the liver and restored the integrity of the intestinal barrier in the offspring.

Acknowledgments: Reproduction Biology Center - Federal University of Juiz de Fora - Brasil

Financial support: This work was supported by the Redes Mineiras de Bioterismo e Toxicologia - TOXIFAR – from the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG.

Conflicts of interest: none

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals of CONCEA (National Council for Animal Experiment Control) of Brazil and has been approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Juiz de Fora. The methodology applied in this study was approved and registered under number 06/2018.

References

1. Braz M, de Assumpção D, Barros MB de A, Barros Filho A de A. Added sugar intake by adolescents: A population-based study. *Cienc e Saude Coletiva*. 2019;24(9):3237–46.
2. Rodríguez L, Panadero MI, Roglans N, Otero P, Álvarez-Millán JJ, Laguna JC, et al. Fructose during pregnancy affects maternal and fetal leptin signaling. *J Nutr Biochem [Internet]*. 2013;24(10):1709–16.
3. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Ver*. 2009 Feb;30(1):96–116.
4. Lecoutre S, Oger F, Pourpe C, Butruille L, Marousez L, Dickes-Coopman A, et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Mol Metab*. 2017;6(8):922–30.
5. Sarker G, Litwan K, Kastli R, Peleg-Raibstein D. Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–17.
6. Lecoutre S, Petrus P, Rydén M, Breton C. Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. Vol. 29, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.; 2018. p. 675–85.
7. Thomas L V., Ockhuizen T, Suzuki K. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. *Br J Nutr [Internet]*. 2014;112(S1):S1–18.
8. Taira R, Yamaguchi S, Shimizu K, Nakamura K, Ayabe T, Taira T. Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. *J Clin Biochem Nutr*. 2015;56(2):149–54.
9. Smits SA, Marcobal A, Higginbottom S, Sonnenburg JL, Kashyap PC. Individualized Responses of Gut Microbiota to Dietary Intervention Modeled in Humanized Mice. *mSystems*. 2016;1(5):3–8.
10. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718–23.
11. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017;17(1).
12. Rodrigo S, Fauste E, de la Cuesta M, Rodríguez L, Álvarez-Millán JJ, Panadero MI, et al. Maternal fructose induces gender-dependent changes in both LXR α promoter methylation and cholesterol metabolism in progeny. *J Nutr Biochem [Internet]*. 2018;61:163–72.
13. Jordan S, Baker B, Dunn A, Edwards S, Ferranti E, Mutic AD, et al. Maternal-Child Microbiome: Specimen Collection, Storage, and Implications for Research and Practice. *Nurs Res*. 2017;66(2):175–83.
14. Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial changes during

- pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol.* 2016;7(JUL):1–13.
15. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm.* 2006;42(1):1–16.
 16. Pinheiro IL. Murinometric Evaluations and Feed Efficiency in Rats from Reduced Litter During Lactation and Submitted or Not to Swimming Exercise. 2011;17(12):49–55.
 17. Silva A, Santos M, Franca S, Silva V, Silva L, Figueiredo U, et al. Acute and Subchronic Antihyperglycemic Activities of *Bowdichia virgilioides* Roots in Non Diabetic and Diabetic Rats. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2015;4(1):57.
 18. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Campello Carvalheira JB, De Oliveira Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci.* 2003;73(11):1369–81.
 19. Tolosa E. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. Barueri SP: Editora Manole Ltda; 2003.
 20. ABREU ICME DE. Esteatose Hepática Em Ratas Hipercolesterolêmicas E O Envolvimento Do Estresse Oxidativo . 2013;62. Available from: http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3351/1/DISSERTAÇÃO_O_CaracterizaçãoHistológicaEstaetose.pdf
 21. Arbex PM, Moreira MEDC, Toledo RCL, de Moraes Cardoso L, Pinheiro-Sant'ana HM, Benjamin LDA, et al. Extruded sorghum flour (*Sorghum bicolor* L.) modulate adiposity and inflammation in high fat diet-induced obese rats. *J Funct Foods.* 2018;42.
 22. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):4557–76.
 23. Lineker C, Kerr PM, Nguyen P, Bloor I, Astbury S, Patel N, et al. High fructose consumption in pregnancy alters the perinatal environment without increasing metabolic disease in the offspring. *Reprod Fertil Dev.* 2016;28(12):2007–15.
 24. Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira CLLF, Bressan J, Peluzio M do CG. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res [Internet].* 2012;32(9):637–47.
 25. Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep [Internet].* 2016;6(February):1–17.
 26. Bernaud FSR, Rodrigues TC. Fibra alimentar - Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(6):397–405.
 27. Paula LD De, Marques CF, Chauld SG. Efeitos produzidos pela ingestão de fibras alimentares: solúveis e insolúveis em camundongos Effects produced by the ingestion of food fibers: soluble and insoluble in mice. 2009;55–60.

28. Cole M, Coleman D, Hopker J, Wiles J. Improved gross efficiency during long duration submaximal cycling following a short-term high carbohydrate diet. *Int J Sports Med.* 2014;35(3):265–9.
29. Fullston T, Teague EMCO, Palmer NO, Deblasio MJ, Mitchell M, Corbett M, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J.* 2013;27(10):4226–43.
30. Starling AP, Sauder KA, Kaar JL, Shapiro ALB, Siega-riz AM, Dabelea D. Maternal Dietary Patterns during Pregnancy Are Associated with Newborn Body Composition. *J Nutr Nutr Epidemiol.* 2017;(C):1–6.
31. Loy SL, Wee PH, Colega MT, Cheung YB, Aris IM, Chan JKY, et al. Maternal Night-Fasting Interval during Pregnancy Is Directly Associated with Neonatal Head Circumference and Adiposity in Girls but Not Boys. *J Nutr [Internet].* 2017;147(7):1384–91.
32. Gregoraszczyk E, Slupecka M, Wolinski J, Hejmej A, Bilinska B, Fiedor E, et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation had gender difference effect on adiponectin in rat offspring. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67(4):543–53.
33. Song A, Astbury S, Hoedl A, Nielsen B, Symonds ME, Bell RC. Lifetime exposure to a constant environment amplifies the impact of a fructose-rich diet on glucose homeostasis during pregnancy. *Nutrients.* 2017;9(4).
34. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 2015;9(1):1–15.
35. Duranti S, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. Obesity and microbiota: an example of an intricate relationship. *Genes Nutr.* 2017;12(1).
36. Yue S-J, Liu J, Wang A-T, Meng X-T, Yang Z-R, Peng C, et al. Berberine alleviates insulin resistance by reducing peripheral branched-chain amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316:73–85.
37. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(2):261–7.
38. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23–46.
39. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab [Internet].* 2018;27(2):351-361.e3.
40. Rodríguez L, Panadero MI, Rodrigo S, Roglans N, Otero P, Álvarez-Millán JJ, et al. Liquid fructose in pregnancy exacerbates fructose-induced dyslipidemia in adult female offspring. *J Nutr Biochem [Internet].* 2016;32:115–22.
41. Gazioglu SB, Akan G, Atalar F, Erten G. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(12):15919–25.

42. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*. 2010;5(8).
43. Morrison CD, Huypens P, Stewart LK, Gettys TW. Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792(5):409–16.
44. Guo Y, Wang Z, Chen L, Tang L, Wen S, Liu Y, et al. Diet induced maternal obesity affects offspring gut microbiota and persists into young adulthood. *Food Funct*. 2018;9(8):4317–27.
45. Zambrano E, Nathanielsz PW. Relative contributions of maternal Western-type high fat, high sugar diets and maternal obesity to altered metabolic function in pregnancy. *J Physiol*. 2017;595(14):4573–4.
46. Rudolph MC, Jackman MR, Presby DM, Houck JA, Webb PG, Johnson GC, et al. Low neonatal plasma n-6/n-3 PUFA ratios regulate offspring adipogenic potential and condition adult obesity resistance. *Diabetes*. 2018;67(4):651–61.
47. Fergusson MA, Koski KG. Comparison of Effects of Dietary Glucose versus Fructose During Pregnancy on Fetal Growth and Development in Rats. *J Nutr [Internet]*. 1990 Nov 1;120(11):1312–9.
48. Song Y, Yu Y, Wang D, Chai S, Liu D, Xiao X, et al. Maternal high-fat diet feeding during pregnancy and lactation augments lung inflammation and remodeling in the offspring. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015;207:1–6.
49. Oshio LT, Andreazzi AE, Lopes JF, Sá JP De, Bolotari M, Costa VMG, et al. A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations. *J Dev Orig Health Dis*. 2019;1–11.
50. Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod*. 2012;27(5):1391–400.
51. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: Consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol*. 2005;565(1):3–8.
52. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One*. 2015;10(5).
53. Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Rokana N, Kumar R, et al. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):279–95.
54. Mann PE, Huynh K, Widmer G. Maternal High Fat Diet and its Consequence on the Gut Microbiome: A Rat Model. *Gut Microbes*. 2017;0976.
55. Fao J, Working WHO, Report G, Guidelines D, London F. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002;1–11.

56. Lagkouvardos I, Pukall R, Abt B, Foesel BU, Meier-Kolthoff JP, Kumar N, et al. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nat Microbiol* [Internet]. 2016;1(10):16131.
57. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. *Front Microbiol*. 2017;8:563.
58. Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, Araújo TG, Carvalho BM, Rocha GZ, et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2017;50:16–25.
59. Seki Y, Suzuki M, Guo X, Glenn AS, Vuguin PM, Fiallo A, et al. In Utero Exposure to a High-Fat Diet Programs Hepatic Hypermethylation and Gene Dysregulation and Development of Metabolic Syndrome in Male Mice. *Endocrinology*. 2017;158(9):2860–72.
60. O'Reilly JR, Reynolds RM. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(1):9–16.
61. Halkjaer SI, Nilas L, Carlsen EM, Cortes D, Halldórsson TI, Olsen SF, et al. Effects of probiotics (Vivomixx®) in obese pregnant women and their newborn: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016 Oct;17(1):491.
62. Kobyliak N, Virchenko O, Falalyeyeva T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutr J*. 2016 Apr;15:43.
63. Poutahidis T, Kleinewietfeld M, Smillie C, Levkovich T, Perrotta A, Bhela S, et al. Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. *PLoS One*. 2013;8(7).
64. Clayton ZE, Vickers MH, Bernal A, Yap C, Sloboda DM. Early life exposure to fructose alters maternal, fetal and neonatal hepatic gene expression and leads to sex-dependent changes in lipid metabolism in rat offspring. *PLoS One*. 2015;10(11):1–28.
65. Sloboda DM, Li M, Patel R, Clayton ZE, Yap C, Vickers MH. Early life exposure to fructose and offspring phenotype: Implications for long term metabolic homeostasis. *J Obes*. 2014.
66. Liu J, He Z, Ma N, Chen ZY. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on High-Fat Diet-Induced Obesity Linking with Modulation of Gut Microbiota. *J Agric Food Chem*. 2020;68(1):33–47.
67. Bernini LJ, Simão ANC, Alfieri DF, Lozovoy MAB, Mari NL, de Souza CHB, et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. *Effects of probiotics on metabolic syndrome*. *Nutrition*. 2016 Jun 1;32(6):716–9.
68. Masuyama H, Mitsui T, Nobumoto E, Hiramatsu Y. The effects of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in Adiponectin and Leptin gene expression for multiple generations in female mice. *Endocrinology*. 2015;156(7):2482–91.
69. Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jun;15(6):367–78.

70. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Nov;1212:97–113.
71. Hee Kim C, Geun Kim H, Yun Kim J, Ra Kim N, Jun Jung B, Hye Jeong J, et al. Probiotic genomic DNA reduces the production of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Mar 1;328(1):13–9.
72. Kelly CJ, Colgan SP, Frank DN. Of microbes and meals: The health consequences of dietary endotoxemia. Vol. 27, *Nutrition in Clinical Practice.* 2012. p. 215–25.

Table 1 – Final body weight (FBW) (g), nasoanal length (NAL) (cm), food intake (FI) (g/day), energy efficiency coefficient (EEC) (g weight/calorie), Hepatosomatic index (HI) (g weight/liver weight), relative liver weight (LW), relative retroperitoneal fat weight (RFW) and relative perigonadal fat weight (PFW) of females (F0 generation).

	C	HC	CP	HCP	CPP	HCPP
FBW (g)	22.10±0.80	26.11±3.01⁺	25.32±2.41	26.61±2.91	26.5±2.9	25.6±3.1
NAL (cm)	9.82±0.21	10.22±0.21⁺	10.11±0.41	10.62±0.51	10.0±0.1	10.6±0.31[#]
FI (g/day)	4.16±1.94	1.75±0.28⁺	4.23±1.17	2.10±0.51[*]	4.85±1.31	2.02±0.42[#]
EEC (g/cal)	0.053±0.008	0.093±0.020⁺	0.055±0.009	0.083±0.0150[*]	0,055±0,010	0,093±0,016[#]
HI	4.71±0.82	2.61±1.62⁺	5.11±0.42	4.51±0.72	5,1±0,6	4,9±1,0
LW (%)	0.046±0.008	0.037±0.004⁺	0.050±0.004	0.045±0.007	0.052±0.005	0.049±0.010
RFW (%)	0.002±0.001	0.008±0.004⁺	0.001±0.0001	0.006±0.005[*]	0.001±0.0003	0.006±0.0005[#]
PFW (%)	0.009±0.002	0.026±0.016⁺	0.009±0.002	0.024±0.014[*]	0.007±0.004	0.021±0.012[#]
TC (mg/dL)	60.91±14.01	105.02±9.31⁺	73.51±8.12	99.9±21.7	76.2±24.5	101.1±13.1
HDL (mg/dL)	57.73±12.72	86.91±21.31⁺	70.92±9.41	91.3±18.2	62.0±19.2	99.5±24.5
ALT (IU/L)	28.81±5.31	29.11±8.82	27.71±4.41	44.7±17.0[*]	29.3±12.6	30.4±6.5
CRE (mg/dL)	0.10±0.01	0.21±0.02	0.21±0.02	0.21±0.01	0.11±0.02	0.21±0.01[#]

TC - Serum cholesterol concentrations, HDL fraction (mg/dL), ALT – serum alanine amino transferase concentration (IU/L), CRE - serum creatinine concentrations (mg/dL). Data are expressed as means ± standard deviation (MDP) of the analyzed parameter (n=8). The symbols represent significant difference ($P<0.05$) between groups. *CP compared to HCP; ⁺CPP compared to HCPP.

Table 2 – Area (AAT), perimeter (PAT) and diameter (DAT) of perigonadal and retroperitoneal adipose tissue, villus (VI) and crypt (CI) of ileum (VCR) of females (F0 generation).

	C	HC	CP	HCP	CPP	HCPP
AAT (µm)	50.38±13.92	73.59±30.18	52.65±11.10	70.93±32.19	33.07±6.795	73.15±33.93[#]
PAT (µm)	927.3±103.00	927.6±103.30	951.0±69.40	948.6±80.35	798.6±85.30	952.6±55.40[#]
DAT (µm)	250.8±38.19	306.4±54.24	225.8±49.28	286.6±70.27	205.9±22.45	300.2±76.89[#]
VI (µm)	410.6±35.51	458.1±119.6	405.3±27.93	379.5±30.72	370.81±73.99	410.82±34.09
CI(µm)	62.47±6.01	61.85±12.20	59.01±3.31	50.55±7.56	60.41±6.68	52.62±9.39

Data are expressed as means ± standard deviation (MDP) of the analyzed parameter (n=8). The symbols represent significant difference ($P<0.05$) between groups. *CP compared to HCP; *CPP compared to HCPP.

Table 3 – Final body weight (FBW) (g), body weight after weaning (BWW), energy efficiency coefficient (EEC) (g weight/calorie), relative liver weight (RLW), relative retroperitoneal fat weight (RFW) and relative perigonadal fat weight (PFW) and biochemical parameters in F1 males.

	CP	HCP	CPP	HCPP
FBW (g)	21.63±1.02	23.36±0.47*	19.61±2.90	21.60±3.24
BWW (g)	12.01±2.01	17.13±1.94*	9.60±1.54	11.46±2.59
EEC (g/cal)	0.16±0.03	0.18±0.09*	0.19±0.01	0.19±0.05
RLW (%)	0.04±0.002	0.04±0.001	0.05±0.001	0.04±0.001⁺
RFW (%)	0.001±0.0005	0.001±0.0007	0.001±0.0005	0.001±0.0001
PFW (%)	0.006±0.001	0.008±0.001*	0.009±0.001	0.006±0.001⁺
ALT (mg/dL)	59.67±7.95	38.52±6.54	45.71±9.81	35.40±7.18
Uric acid (mg/dL)	2.37±0.58	2.66±0.80	3.01±0.92	2.92±0.56
Glucose (mg/dL)	233.1±10.39	263.8±29.78	251.3±31.59	290.4±52.86
Triglycerides (mg/dL)	67.25±7.95	57.56±7.38	55.64±12.31	49.54±11.77
Total cholesterol (mg/dL)	80.56±1.34	88.85±3.69*	80.30±9.17	89.54±8.61
HDL cholesterol (mg/dL)	74.99±1.44	86.88±6.81*	75.52±5.96	88.41±5.43⁺

Data are expressed as means ± standard deviation (MDP) of the analyzed parameter (n=6). The symbols represent significant difference ($P<0.05$) between groups. *CP compared to HCP; ⁺CPP compared to HCPP;

Table 4 – Final body weight (FBW) (g), body weight after weaning (BWW), energy efficiency coefficient (EEC) (g weight/calorie), relative liver weight (RLW), relative retroperitoneal fat weight (RFW) and relative perigonadal fat weight (PFW) and biochemical parameters in F1 females.

	CP	HCP	CPP	HCPP
FBW (g)	18.05±0.54	19.40±0.82*	16.72±0.77	17.07±0.55
BWW (g)	10.42±2.16	15.75±2.27⁺	9.25±1.74	10.75±2.08
EEC (g/cal)	0.11±0.01	0.13±0.02*	0.12±0.07	0.13±0.02
RLW (%)	0.04±0.002	0.05±0.007	0.05±0.001	0.04±0.001⁺
RFW (%)	0.001±0.0004	0.004±0.0001*	0.001±0.0004	0.001±0.0001
PFW (%)	0.003±0.001	0.008±0.001*	0.006±0.002	0.003±0.001⁺
ALT (mg/dL)	47.28±7.29	31.47±7.40	35.78±7.13	28.21±4.28
Uric acid (mg/dL)	2.74±0.57	2.10±0.17	2.78±0.60	3.12±0.73
Glucose (mg/dL)	222.11±4.17	271.42±15.74*	239.41±16.18	279.81±5.29⁺
Triglycerides (mg/dL)	50.40±5.97	39.50±3.18*	55.37±9.10	48.59±9.18
Total cholesterol (mg/dL)	76.10±6.79	73.02±8.19	77.51±5.86	71.36±6.53
HDL cholesterol (mg/dL)	64.21±5.28	63.33±4.35	69.96±8.76	69.83±3.25

Data are expressed as means ± standard deviation (MDP) of the analyzed parameter (n=6). The symbols represent significant difference ($P<0.05$) between groups. *CP compare to CPP; ⁺HCP compare to HCPP. ALT: alanine aminotransferase.

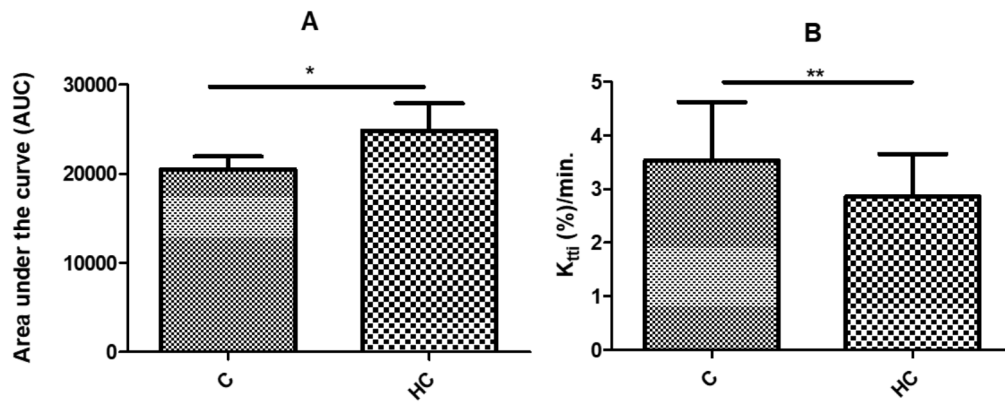


Figure 1 – The A and B graph represents the F0 total area under the curve for GTT (a) and insulin decay rate for ITT (b) of the mice treated with control (C) and hypercaloric diet (HC). Data are expressed as mean \pm SD. *P<0.0001; **P<0.001

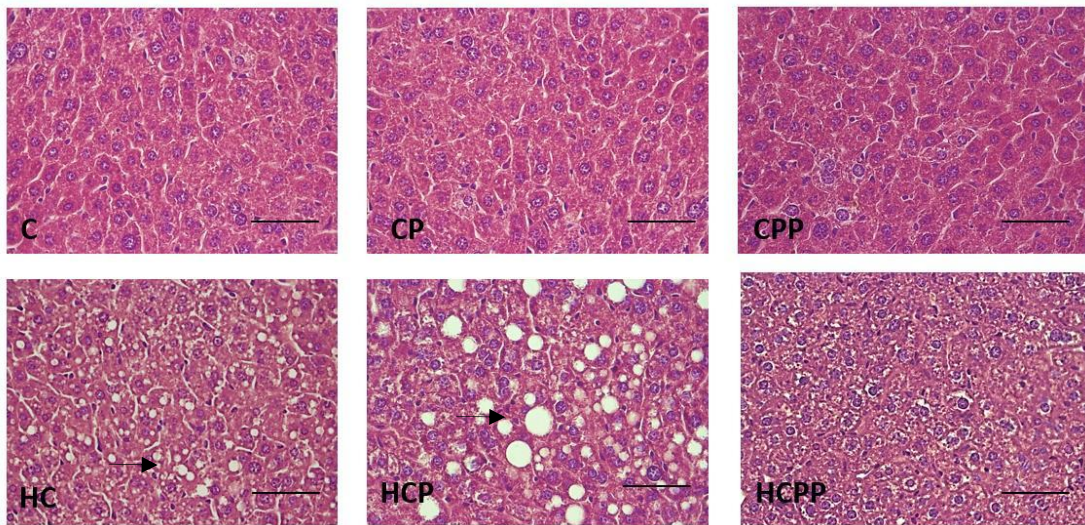


Figure 2 – Representative photomicrographs of liver sections of F0 generation obtained of the mice treated with control (C) and hypercaloric diet (HC). Stained with H&E. Arrows indicate hepatocytes with microvesicular (HC) and macro steatosis (HCP). Bar = 20 μ m.

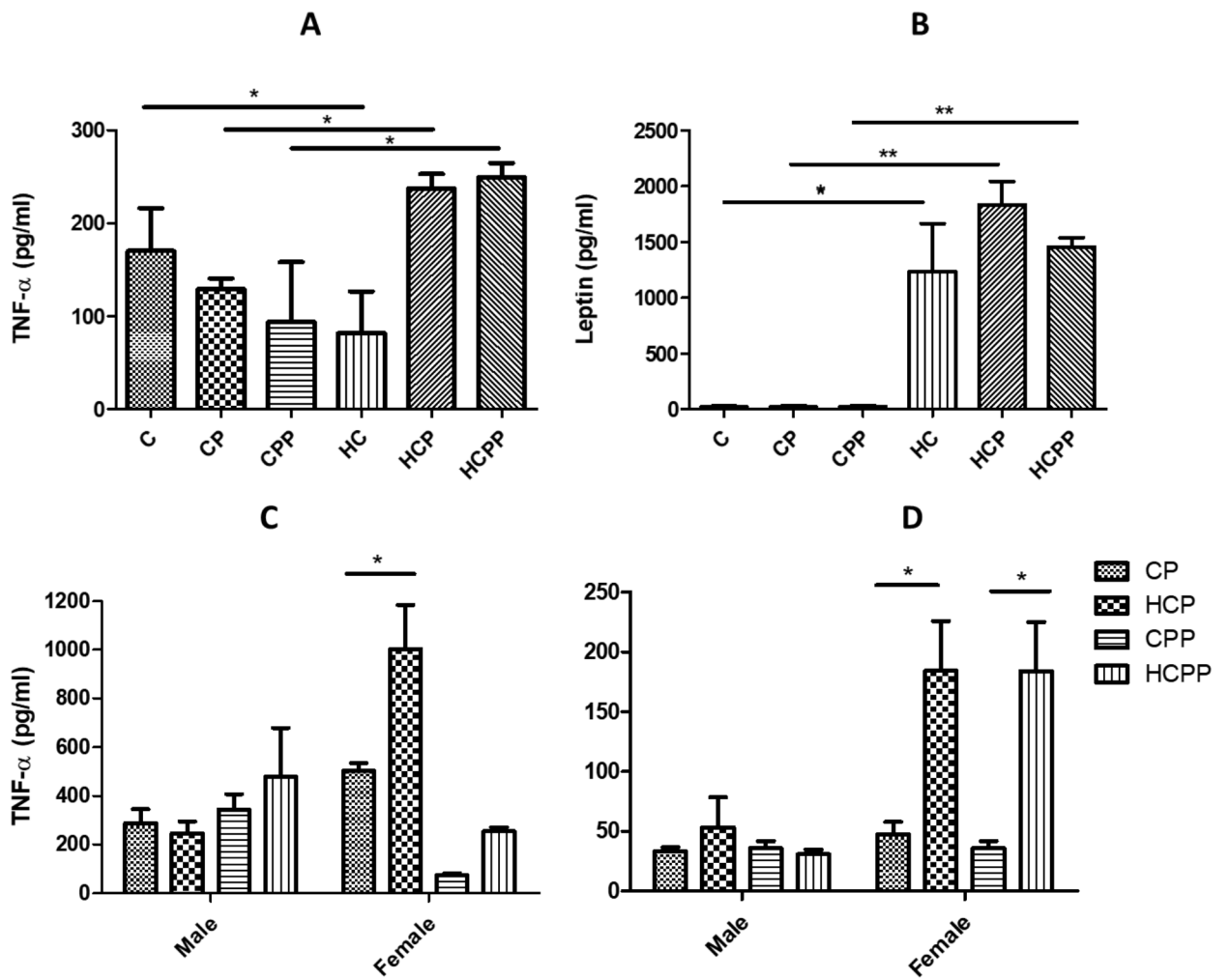


Figure 3 – Graphs representing TNF α and leptin in mice serum after the treatments. A and B: F0 generation; C and D: F1 generations. Data are expressed as mean \pm SD. *P<0.05; **P<0.001.

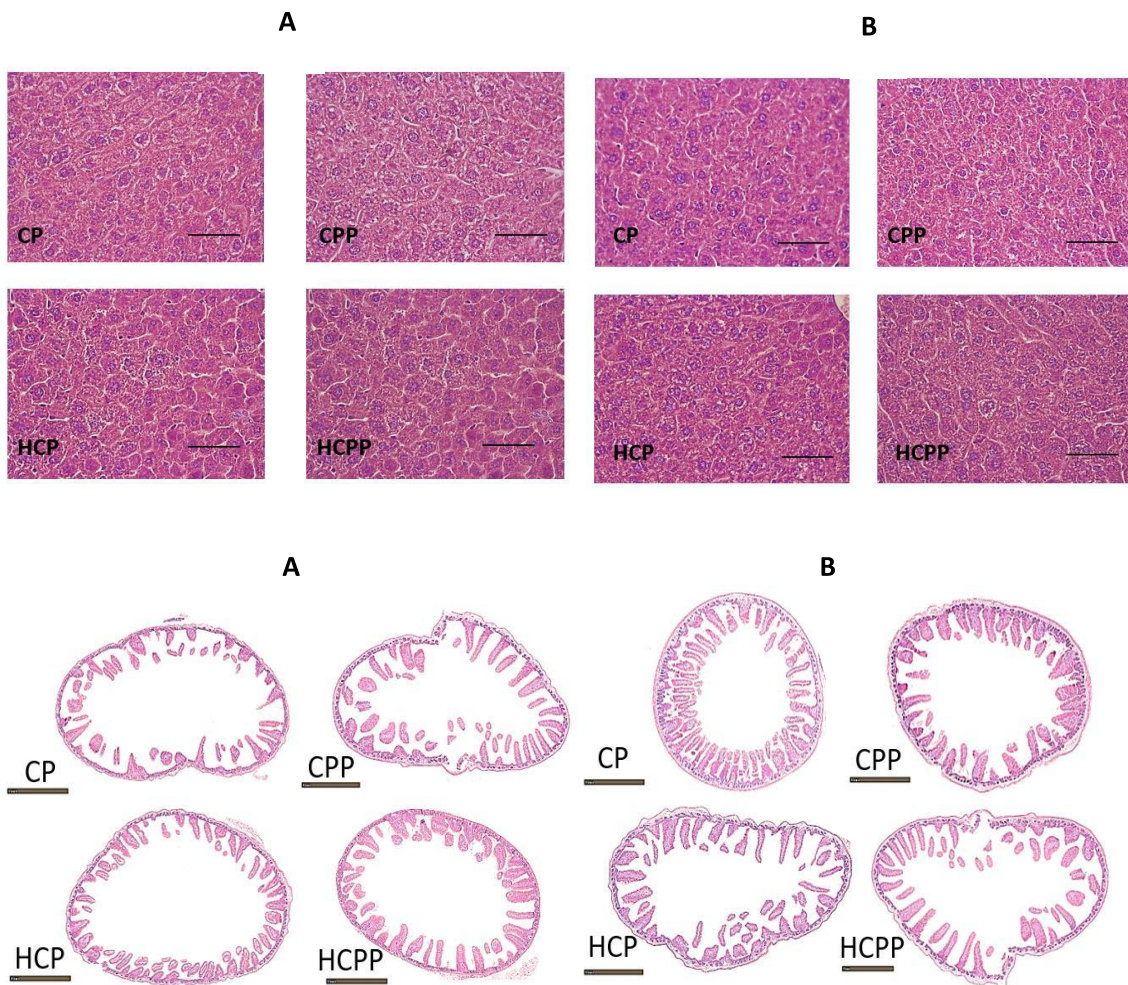


Figure 4 – Representative photomicrographs of liver and intestine sections of F1 generation of male (A) and female (B) obtained after treatments. Stained with H&E. Bar = 20µm.