

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Nicole Hiller Bondarczuk

**Estudo de diferentes dietas e
suplementação de probióticos
durante a gestação em parâmetros
morfológicos e inflamatórios na
placenta e perfil bioquímico em
camundongos.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2022

Nicole Hiller Bondarczuk

**Estudo de diferentes dietas e
suplementação de probióticos
durante a gestação em parâmetros
morfológicos e inflamatórios na
placenta e perfil bioquímico em
camundongos.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau
de Mestre

Orientadora: Dra. Márcia Giovenardi
Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Moura

Porto Alegre
2022

Catalogação na Publicação

Hiller Bondarczuk, Nicole

Estudo de diferentes dietas e suplementação de probióticos durante a gestação em parâmetros morfológicos e inflamatórios na placenta e perfil bioquímico em camundongos / Nicole Hiller Bondarczuk. -- 2022.
65 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Profa. Dra. Márcia Giovenardi ;
coorientador(a): Ana Carolina Moura.

1. Placenta. 2. Lactobacillus rhamnosus. 3. Restrição Calórica. 4. Dieta Hiperlipídica. 5. DOHaD. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e contou com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico este trabalho a Deus, fonte de sabedoria.
Aos meus pais, Jorge e Marli, pelo incentivo durante toda minha vida.
Ao amor da minha vida, Fabinho.
A todos os animais que sacrificam suas vidas em prol da ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e meu irmão Eduardo, por acreditarem em mim, me motivarem, me ajudarem, serem minha base. Eu sou muito privilegiada e abençoada por pertencer a esta família.

Ao meu marido, Fábio, sempre respeitando meus estudos e dedicação durante o mestrado, por ter me incentivado a seguir estudando e por tornar minha jornada mais leve.

A minha orientadora Profa. Márcia, por estar sempre disposta a responder, por ser sincera, por ter me ensinado tanto, por me tratar e me entender com respeito e carinho.

A minha coorientadora Ana, que honra que tive de te ter conhecido! Por teres me ajudado em todo o processo do mestrado, estar presente, muito bom de trabalhar com alguém tão querida!

A minha colega de projeto, Natália, por ter sido muito companheira, parceira e ter me ajudado muito.

A parceria com a Prof. Amanda de Souza da Motta e a Gabriela Merker Breyer, pela prontidão de nos atender nas demandas de produção dos probióticos e pelo profissionalismo.

A prof. Alethea por pacientemente ter nos ajudado nas análises bioquímicas.

Aos meus colegas de trabalho na UFCSPA, pela parceria na realização de experimentos e por serem tão gentis.

.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS.....	4
AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Nutrição e ambiente intrauterino.....	13
1.2 Teoria da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD).....	13
1.3 A Placenta.....	15
1.4 Dietas.....	17
1.5 Probióticos.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	59
APROVAÇÃO DO CEUA E CURRÍCULO LATTES.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CONT: controle

DNA: ácido desoxirribonucléico

DOHaD: Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (do inglês, *developmental origins of health and disease*)

EO: estresse oxidativo

FAO: Organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

IL6- β : interleucina 6- β

IL-10: interleucina-10

GD: dia gestacional (do inglês, *Gestational Day*)

HFD: dieta hiperlipídica (do inglês, *high-fat diet*)

RC: restrição calórica

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

OMS: Organização Mundial de Saúde

PROB: probióticos

UNK: do inglês, *natural killers uterinas*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -. Esquema que representa intervenções ambientais, como a dieta, durante a fase gestacional e que alteram epigeneticamente o fenótipo do adulto e mudam sua suscetibilidade a doenças metabólicas. 15

FIGURA 2 - Efeitos da dieta materna na imunomodulação e sua influência no desenvolvimento da prole.....20

FIGURA 3 - Possíveis rotas de a suplementação probiótica materna afetar a microbiota intestinal do neonato e assim, modificar o sistema imune.23

RESUMO

A placenta é um importante órgão de transição que forma uma ponte entre a mãe e o feto durante a gravidez. As alterações no ambiente intrauterino impactam a saúde do feto podendo ser influenciada pela dieta materna. No presente estudo, nosso objetivo foi investigar os efeitos de intervenções na dieta materna (restrição calórica e dieta hiperlipídica) e suplementação de probióticos durante a gravidez na morfologia, biometria e mediadores inflamatórios na placenta, além dos parâmetros bioquímicos séricos maternos. Camundongos fêmeas receberam dietas padrão (CONT), restritivas (RD) em 30% a menos que o controle, ou dietas hiperlipídicas (HFD) por 16 semanas, durante o acasalamento e gestação, até o 18º dia de gestação (GD). Durante a gestação, os grupos CONT+PROB e HFD+PROB receberam por gavagem o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, contagens viáveis de $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, 3 vezes por semana, os grupos CONT, RD ou HFD foram gavados com leite desnatado na mesma frequência em que os grupos que receberam probióticos. No 18º GD as fêmeas foram eutanasiadas, o sangue troncular e a placenta foram coletados. No sangue foram analisadas as concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicerídeos e na placenta, sua morfologia e citocinas inflamatórias. Não houve diferença significativa no número de fetos, reabsorção fetal, taxa de viabilidade, mediadores inflamatórios na placenta, glicose, colesterol totais e triglicerídeos analisados no soro das mães que receberam dietas diferentes ou nos grupos com suplementação de probióticos. Em relação à morfologia placentária, HFD e HFD+PROB apresentaram aumento da espessura da zona labiríntica quando comparados a CONT+PROB. Em conclusão, esses achados sugerem que as dietas utilizadas neste modelo, assim como a suplementação probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 durante a gestação, não impactam os mediadores inflamatórios nos parâmetros placentários e bioquímicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus rhamnosus*, restrição calórica, dieta hiperlipídica, DOHaD.

ABSTRACT

The placenta is an important transitional organ forming a bridge between mother and fetus during pregnancy. Changes in the intrauterine environment impact the health of the fetus may be influenced by the maternal diet. In the current study, our objective was to investigate the effects of interventions in the maternal diet (caloric restriction and high fat diet) and probiotics supplementation during pregnancy on morphology, biometry and inflammatory mediators in the placenta, in addition to maternal serum biochemical parameters. Female mice received standard (CONT), restrictive (RD) by 30% less than control intake, or high-fat (HFD) diets for 16 weeks, during mating and pregnancy, until the 18th gestation day (GD). During pregnancy, the CONT and HFD groups received by gavage the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, viable counts were $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, 3 times a week. During pregnancy, the CONT+PROB and HFD+PROB groups received by gavage the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, viable counts were $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, 3 times a week, the groups RD, CONT and HFD were gavaged with skim milk at the same frequency as the probiotic groups. On the 18th GD the females were euthanized, the trunk blood and placenta was collected. In the blood, serum concentrations of glucose, total cholesterol and triglycerides were analyzed and in the placenta, its morphology and inflammatory cytokines were analyzed. There was no significant difference in the number of pups, fetal resorption, viability rate, inflammatory mediators in the placental, glucose, total cholesterol and triglycerides analyzed in the serum of the mothers who received different diets or in the groups with probiotic supplementation. Regarding placental morphology, HFD and HFD+PROB showed increased thickness of the labyrinth zone when compared to CONT+PROB. In conclusion, these findings suggest that the diets used in this model, as well as the *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 probiotic supplementation during pregnancy, did not impact the inflammatory mediators in the placental and biochemical parameters.

KEYWORDS: *Lactobacillus rhamnosus*, restrictive diet, high-fat diet, DOHaD.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nutrição e ambiente intrauterino

A alimentação materna é fundamental para o pleno desenvolvimento do feto [1]. Estudos têm evidenciado a relação complexa entre a dieta da gestante e as condições de saúde do recém-nascido, as modificações do ambiente intrauterino e os padrões de crescimento com desfechos metabólicos na vida adulta [2]. Fatores ambientais nos quais a mãe possa ser exposta podem ocasionar uma reprogramação celular fetal e assim, modificar a vida do animal quando adulto [3]. Além disso, alterações no suporte nutricional placentário podem afetar o desenvolvimento fetal [4].

1.2 Teoria da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD)

Na década de 60, surgiu a “hipótese do genótipo poupador”, que se baseava na possibilidade de uma mutação ser tornar uma adaptação benéfica para indivíduos que foram expostos a escassez alimentar e sendo este caráter transmitido para outras gerações [5]. Já em 1970 iniciaram-se os estudos com os descendentes das mães que passaram pela fome holandesa, pois durante a Segunda Guerra Mundial a Alemanha cercou a Holanda privando-a de abastecer-se, e observou-se que havia diferenças nas condições corporais de acordo com a fase em que a gestante sofreu desnutrição. Neste estudo, observaram que se a desnutrição ocorresse no primeiro semestre gestacional estes indivíduos apresentavam tendência à obesidade, caso a desnutrição fosse ao terço gestacional final a incidência a obesidade era baixa [6]. Na década de 80, Baker propõe a teoria do “fenótipo poupador”, em que as situações adversas intrauterinas e durante a infância aumentariam as chances de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta [7]. Estes estudos e teorias surgiram

como tentativas de entender a importância da nutrição adequada em períodos críticos de vida.

A teoria da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHAD) surgiu como um dos estudos que tenta explicar como intervenções ocorridas durante fases precoces do desenvolvimento humano podem promover o desenvolvimento de doenças crônicas ao longo da vida [8]. Mudanças, como intervenções na dieta materna, durante períodos de alta plasticidade neuronal, como a vida pré-natal, pode alterar a ordem do funcionamento do organismo e implicar em consequências ao longo da vida [8,9,10]. O ambiente intrauterino com seus hormônios, produção de citocinas e metabólitos modulam a programação fetal devido a interação entre eles [8].

Devido aos estudos de DOHAD existem evidências de que a alimentação durante o período de desenvolvimento possa alterar epigeneticamente a expressão gênica e assim afetar a saúde do indivíduo a longo prazo [8]. A epigenética é definida como modificações nas expressões gênicas herdáveis sem alterar a sequência do DNA [11]. Estes processos epigenéticos são feitos através de modificações de histonas, regulação de RNA não codificante e pelo processo mais descrito no contexto de DohaD, a metilação do DNA [12]. Assim, a dieta materna e outros fatores ambientais são os principais reguladores dos mecanismos epigenéticos que irão reprogramar fenotipicamente o feto e assim, torná-lo mais suscetível ou menos a doenças metabólicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e a obesidade [13,14].

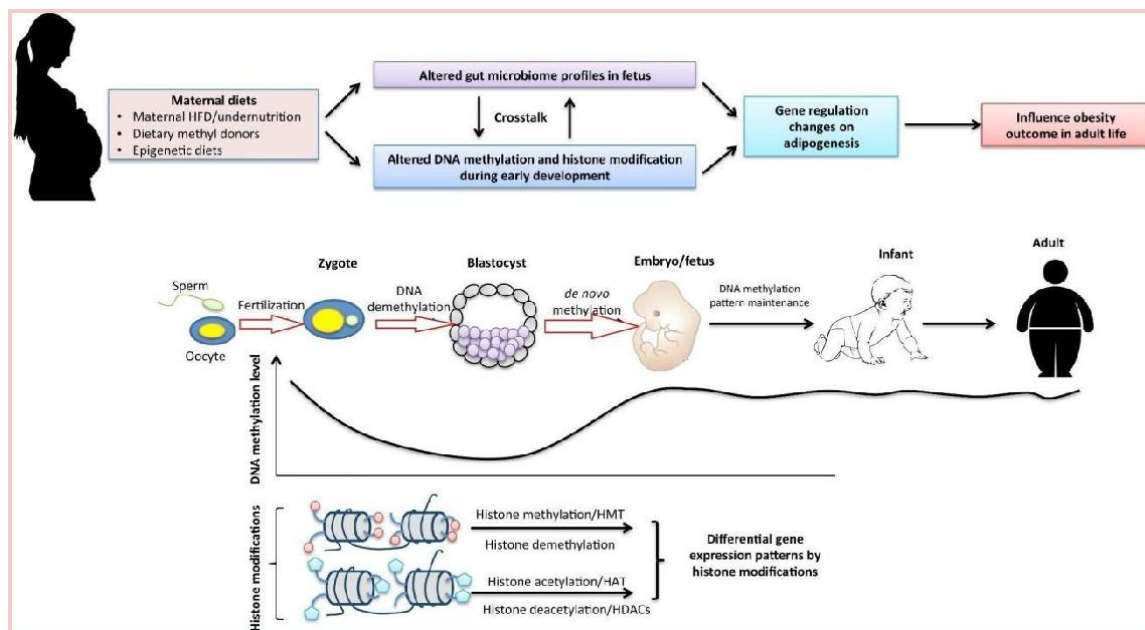


Figura 1. Esquema que representa intervenções ambientais, como a dieta, durante a fase gestacional e que alteram epigeneticamente o fenótipo do adulto e mudam sua suscetibilidade a doenças metabólicas (Figura adaptada de YUANYUAN.L., 2018).

1.3 Placenta

A placenta é um órgão provisório responsável pelos processos de nutrição, excreção e trocas de gases entre a mãe e o feto. Além disso, a placenta confere proteção imunológica ao feto através de hormônios e fatores de crescimento que suas células especializadas produzem [16]. A placenta regula o transporte de ácidos graxos, este transporte é feito por difusão simples controlada pelo gradiente de concentração entre a circulação materna e a fetal ou por difusão facilitada com as proteínas de transporte da membrana como reguladoras [17].

Assim como a implantação, o processo de formação e organização da placenta envolve a interação de células de ambos os organismos, tanto materno quanto fetal, e isso varia bastante entre as diferentes espécies. A placenta de roedores é do tipo hemocorial, pois os vasos fetais são banhados diretamente

pelo sangue materno [18]. E por fazer a comunicação entre mãe e feto por um local restrito, cotilédone, é classificada como discóide [19].

Em roedores a formação da placenta começa com a implantação do blastocisto no corno uterino, este processo de implantação finaliza-se no momento em que o feto está encoberto pelo epitélio endometrial e está totalmente incorporado à parede uterina [16,17]. Nos camundongos entre os dias 10,5 e 11,5 a placenta já está completamente estruturada [16]. O útero de roedores contém dois cornos uterinos com múltiplos embriões, cada embrião possui uma placenta individual [17].

O desenvolvimento da placenta é um processo complexo de diferenciação de células derivadas do blastocisto e de células maternas. A comunicação entre os dois organismos, que formam a interface materno-fetal, é fundamental para o desenvolvimento adequado do embrião e, conseqüentemente, para o sucesso da gestação [20,21]. A placenta é formada por uma porção fetal, originada do saco coriônico, a placa coriônica; e uma porção materna, originada do endométrio, a decídua basal. Estes componentes delimitam o espaço interviloso, local onde o sangue materno comunica-se através de lobos com o sangue fetal que se estendem da placa coriônica [22].

A estrutura placentária de mamíferos divide-se em 3 camadas: a mais externa chamada decídua mesometrial, que possui as células do útero e a vascularização materna, que são responsáveis pelo transporte sanguíneo ao sítio de implantação; a camada intermediária definida como zona juncional, camada endócrina [23]; e camada mais interna, zona labirinto onde ocorrem as trocas de nutrientes efetivamente [24].

A decídua materna, que é a camada mais distal do feto, é composta por células endometriais modificadas. Estas células secretam citocinas, hormônios e fatores de crescimento. Além destas, as células natural killers uterinas (uNK) estão presentes e são responsáveis pela angiogênese e imunologia. Nesta camada encontramos vasos maternos encobertos pelas células trofoblásticas gigantes e estes canais atravessam até o labirinto [25].

A zona juncional é estreita e avascular. É composta por espongiotrofoblasto e células trofoblásticas gigantes parietais [25].

O labirinto fica entre a zona juncional e a placa coriônica, formado por células de origem materna e embrionária. É formado por uma rica camada de vasos, pois é nesta camada onde ocorrem as trocas de nutrientes, metabólitos e gases entre a mãe e o feto [25].

A placenta não é apenas um canal passivo de transmissão de nutrientes ao feto, a placenta responde às mudanças ambientais e modifica o transporte placentário, como exemplo podemos citar a obesidade materna que leva a adiposidade fetal devido a uma maior transferência de nutrientes [26].

Além disso, algumas gestantes diabéticas e/ou obesas apresentam um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau. Nestes casos inflamatórios a placenta produz altos níveis de citocinas inflamatórias [27,28]. Estudos com gestantes obesas comprovaram que a obesidade materna está relacionada com estresse hipóxico fetal e ao supercrescimento placentário [29]. Estudos com ovelhas mostraram uma tendência à desnutrição fetal quando há abundância da oferta de nutrientes através da dieta materna no final da gestação sugerindo uma alteração na vascularização placentária e no transporte de nutrientes [30]. Ou seja, apesar de existir fortes evidências de que intervenções na dieta alterem o desenvolvimento e o transporte placentário [31,32], ainda existem resultados contraditórios nas pesquisas devido às diferentes dietas, que diferem em macro e micronutrientes, como também, o tempo de exposição a estas dietas obesogênicas [33]. Outro estudo com ratas alimentadas por 8 semanas com dieta de cafeteria, foram analisados marcadores inflamatórios plasmáticos e o gene inflamatório no tecido adiposo materno, fígado fetal e em diferentes zonas placentárias, não aumentando o estado inflamatório da mãe, da placenta ou do feto no final da gestação [34].

1.4 Dietas

Estima-se que 35% dos homens e 40% das mulheres nos Estados Unidos sejam obesos [35]. No Brasil, calcula-se que até 2030, 68% da população será obesa [36]. Mundialmente, a obesidade infantil afeta 107 milhões de crianças [37]. Entretanto, segundo relatório da ONU de 2020 a fome aumentou no mundo nos últimos anos, principalmente na África [38]. Ainda de acordo com este relatório, para cada 10 homens com insegurança alimentar, havia 11 mulheres com insegurança alimentar em 2020 (comparados a 10,6 em 2019) e quase um terço das mulheres em idade reprodutiva sofriam de anemia. E, como consequência, em 2020 mais de 149 milhões de crianças padecia de desnutrição crônica [38]. Estas desigualdades nutricionais tornam a necessidade de estudo, pesquisa e compreensão dos mecanismos envolvidos uma urgência no âmbito acadêmico a fim de providenciar melhores capacitações nos sistemas de saúde para atender esta população com melhor eficiência.

O ganho de peso durante a gestação aumenta as chances das mães desenvolverem hipertensão, diabetes gestacional e os filhos obesidade infantil [39,40]. Já a restrição alimentar materna pode predispor a prole ao desenvolvimento de doenças cardíacas e obesidade [41].

A restrição calórica (RC) é uma realidade para boa parte da população mundial e, por isso, seus efeitos têm sido objeto de estudo por parte da comunidade científica. Já é bem consolidado os efeitos que uma dieta RC exerce de benéficamente na cognição durante o processo de envelhecimento e entre outras doenças crônicas [42,43]. O retardo de crescimento intrauterino tem como umas das principais causas a nutrição deficiente e podem acarretar altos índices de morbidade peri e neonatal [44]. Dietas de restrição calórica moderada podem melhorar o aprendizado espacial e atenuar os distúrbios de humor [45]. Os efeitos positivos das dietas de restrição podem ser atribuídos à neurogênese no hipocampo em adultos [46]. Além disso, essas dietas podem ativar vias anti-inflamatórias e antioxidantes [46]. Em um estudo com a RC controlada durante a gestação foi observado que esta dieta protege o cérebro da prole do estresse oxidativo durante a vida adulta [47]. Porém, outros estudos constataram

que a dieta RC durante o período gestacional pode prejudicar o desenvolvimento placentário e assim, dificultar a vascularização e o transporte de nutrientes ao feto, prejudicando sua formação e induzindo a doenças metabólicas ao longo da vida [48, 49, 50]. Por outro lado, estudos com humanos e animais demonstraram que a restrição calórica durante o período gestacional pode diminuir a massa de células β - pancreáticas e sua disfunção e aumentar a intolerância da glicose nesta prole quando adulta [51].

Dietas hiperlipídicas (HFD) são definidas como dietas ricas em calorias e macronutrientes como proteínas, carboidratos e gorduras ou uma combinação destes nutrientes. Observamos que a obesidade em ratos, induzida pelo consumo de dietas HFD causam resistência à insulina periférica, dislipidemia e estresse oxidativo (EO). Além disso, dietas ricas em calorias e gorduras podem prejudicar o processo de memorização e aprendizagem [52].

Estudos em humanos com mães obesas verificou-se o aumento do risco de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional e hipertensão gestacional [53]. A prole das mães obesas aumenta as chances de morte pré-natal e defeitos congênitos [54]. Além disso, a obesidade materna predispõe a prole a nascer com um alto peso e a desenvolver obesidade ao longo da vida [55].

Filhotes de mães alimentadas com dietas ricas em gorduras durante o período gestacional e lactacional apresentaram alta taxa de depósito de gordura corporal, aumento do fator de necrose tumoral (TNF- α) e de interleucina 1 β (IL-1 β) [56]. Em outro estudo com ratos fêmeas Sprague-Dawley, alimentadas com HFD por 5 semanas antes da gestação e durante a gestação, os filhotes apresentaram baixos níveis de leptina ao nascer, o que pode acarretar transtornos alimentares ao longo da vida [57]. Dietas HFD induzem inflamação placentária [58], alteram o transporte placentário modificando o tamanho dos fetos [59] e o aumento do colesterol, disbiose e uma inflamação crônica de baixo grau. [60,61]. Esta inflamação de baixo grau altera o ambiente intrauterino modificando a programação fetal e assim, resultando em fetos com desenvolvimento de

síndromes metabólicas [62]. No soro destes fetos de mães alimentadas com HFD foram encontrados aumento nos níveis de TNF- α e de IL-1 β [63].

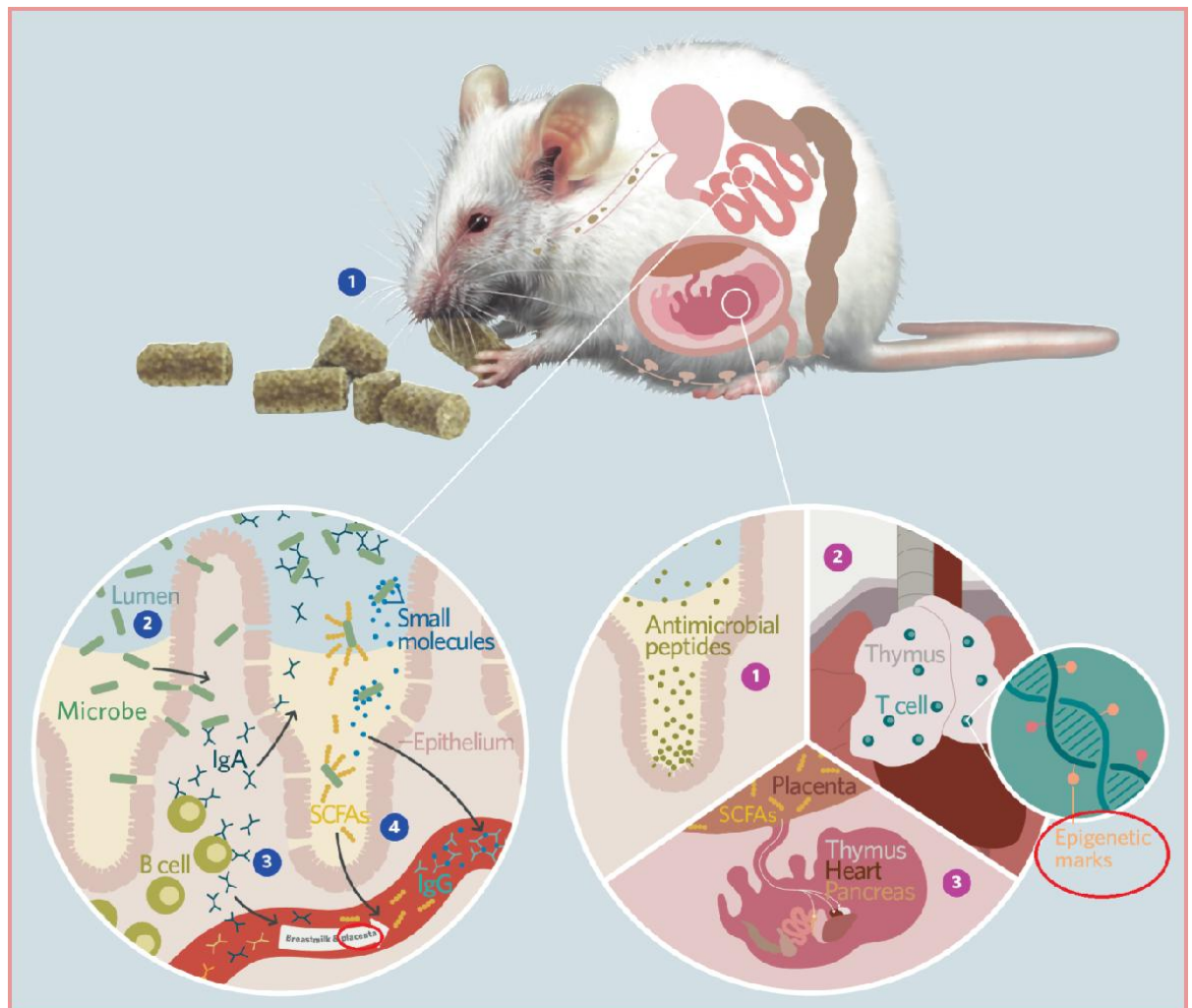


Figura 2. Efeitos da dieta materna na imunomodulação e sua influência no desenvolvimento da prole (Figura modificada de CAROLYN A. THOMSON AND KATHY D. MCCOY .,2021) .

O tempo em que as dietas são fornecidas ocasiona resultados diversos nas pesquisas, afetando resultados bioquímicos como estrutura placentária. Por exemplo, em camundongos C57BL/6J, alimentados com dieta HFD e *high sugar*, por 12 semanas, verificou-se que os animais ficaram com dislipidemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia, durante a gestação [65], já em outro estudo, com

dieta HFD uma semana antes da concepção foi suficiente para elevar os níveis de glicose [66].

No estudo com as mães holandesas que passaram pela fome de 1944-1945, observou-se que aquelas privadas de comida no primeiro terço gestacional e que depois receberam suprimento nutricional adequado tiveram placentas maiores do que as que receberam nutrição adequada durante todo período gestacional [67]. Em ratos, a RC até metade do período gestacional promoveu peso placentário reduzido e zona juncional maior. No entanto, após este período, se elas voltarem a receber dieta normalmente, a placenta volta a sua estrutura e peso normal [68]. Estes estudos mostram a capacidade adaptativa da placenta.

1.5 Probióticos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) PROB são definidos como "microrganismos vivos não patogênicos que quando ingeridos em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos ao organismo" [69]. Já o Instituto Internacional de Ciências da Vida define PROB como "um ingrediente alimentar microbiano vivo que, quando consumido em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde dos consumidores"[70].

Uma das primeiras observações em relação aos efeitos benéficos dos PROB foi feita por Elie Metchnikoff, no começo do século 20, na Bulgária. Ele observou que o consumo de leite fermentado contendo bactérias ácido lácticas aumentava a longevidade da população búlgara [71]. Existem exigências estabelecidas pela FAO/OMS para que um PROB possa ser utilizado na alimentação, e são as seguintes: identidade da cepa, avaliação de segurança, estudos *in vitro* e estudos *in vivo* [71].

Os PROB podem ser usados tanto na prevenção de doenças em indivíduos saudáveis como na atenuação de doenças em indivíduos doentes [72]. Os principais mecanismos de ação dos PROB para beneficiar o hospedeiro são:

competição com bactérias patogênicas por locais de adesão e nutrição, imunomodulação (produção de citocinas), melhoria do sistema imune e produção de neurotransmissores e alteração da funcionalidade da barreira epitelial [73].

O uso dos PROB possibilita uma mudança no perfil das citocinas pró/anti-inflamatórias [74]. Em um estudo com camundongos C57BL/6J, alimentados com HFD, por 12 semanas, e depois administrado oralmente o *L. rhamnosus* foi observado que houve diminuição do peso corporal, glicemia em jejum e diminuição no tamanho das células dos adipócitos, ou seja, pareceu ter propriedades anti-inflamatórias e anti-obesidade [75].

A administração de PROB durante a gravidez é considerada segura [76] e há estudos de que sua administração durante a gestação em humanos alterou os marcadores inflamatórios na placenta, tais como a modificação na expressão gênica de *toll-like receptors* na placenta [77].

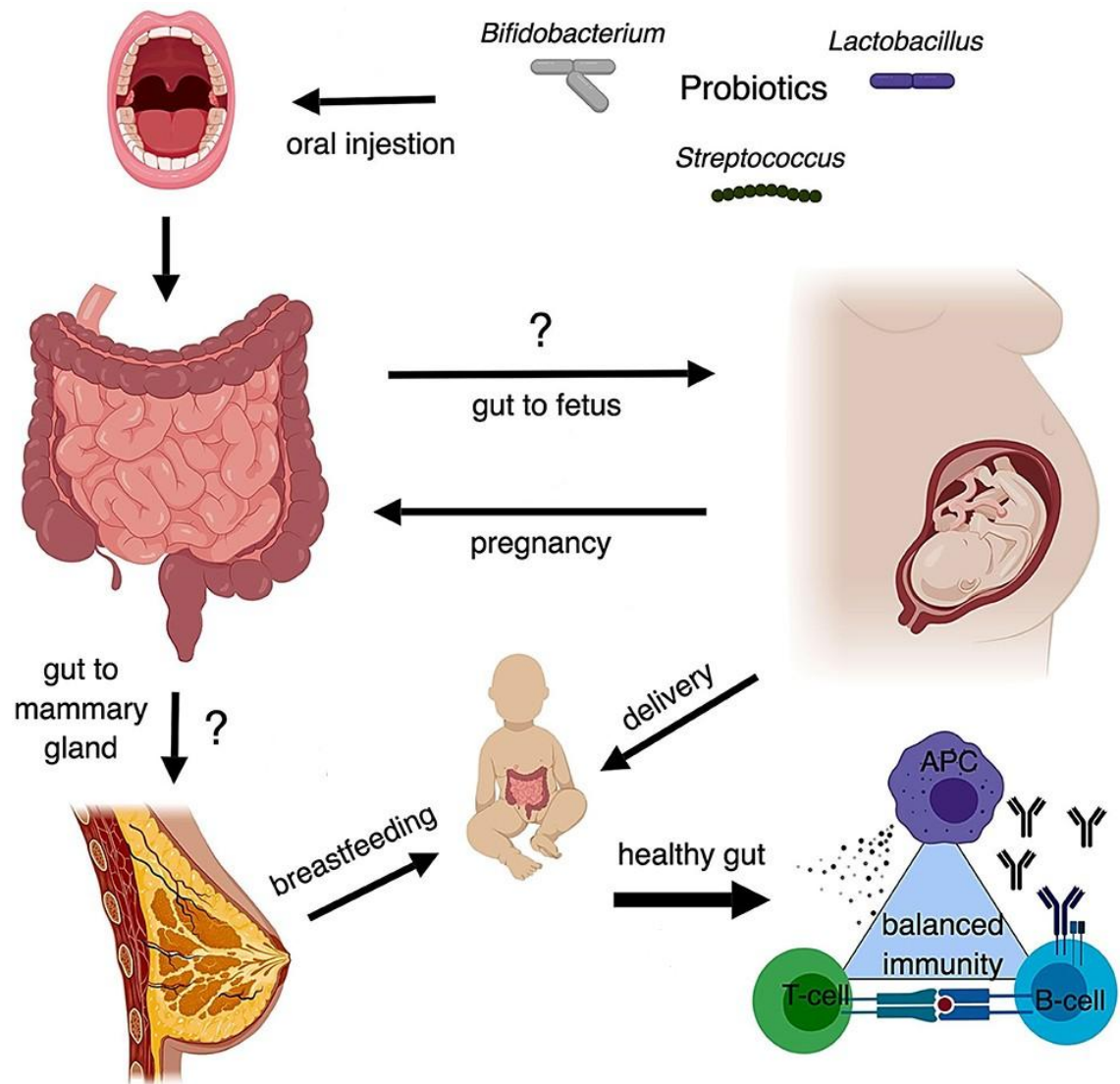


Figura 3. Possíveis rotas da suplementação probiótica materna afetar a microbiota intestinal do neonato e assim modificar o sistema imune (Figura modificada de SWARTWOUT, B. AND X. M. LUO., 2018).

O consumo de *Lactobacillus fermentum* MTCC: leite fermentado 5898 atenuou a dislipidemia, a inflamação e o estresse oxidativo em ratos machos alimentados com dieta rica em colesterol [78]. Camundongas C57BL/6, alimentadas com HFD, por 8 semanas, e em seguida suplementadas por 4 semanas com probióticos *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, BB-12 reduziu o ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de TNF- α placentário em GD12 e mRNA de interleucina-10 (IL-10) em GD19 [80].

Neste trabalho testamos a viabilidade e funcionalidade no hospedeiro um potencial candidato a PROB, isolado de leite cru de búfala. Utilizamos a cepa *Lact. rhamnosus* LB1.5. A fim de uma nova cepa ser considerada segura para o consumo humano são necessários alguns testes *in vitro* antes de serem testados *in vivo*. A inocuidade é testada através da verificação da presença dos fatores de virulência e a suscetibilidade antimicrobiana [81], além dos testes de tolerância gastrointestinal, sobrevivência aos sais biliares e a adesão ao trato gastrointestinal [82]. Por responder positivamente a sua capacidade de adesão, capacidade de agregação e tolerância às condições de simulação do intestino, além de sua associação a resposta transcricional de genes relacionados para adesão, agregação, tolerância ao estresse, reparo de ácido desoxirribonucléico (DNA) e metabolismo central que simulam as condições gastrointestinais, optamos por testar esta cepa *in vivo* [83].

Baseado no exposto, a hipótese central deste estudo é que a restrição calórica e a administração de probióticos no período gestacional poderão proteger a interface materno fetal prevenindo alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas no feto que podem ser causadas pela alimentação materna.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de intervenções na dieta materna (restrição calórica e dieta hiperlipídica) e suplementação de probióticos durante a gravidez na morfologia, biometria e mediadores inflamatórios na placenta, além de parâmetros bioquímicos séricos maternos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o ganho de peso das fêmeas ao longo da administração da dieta;
- Analisar o perfil bioquímico sérico das mães;
- Verificar o número de fetos e reabsorção embrionária (perfil reprodutivo);
- Analisar a morfologia da placenta;
- Determinar os níveis de citocinas na placenta.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado **“Effects of different diets and probiotic supplementation during pregnancy on placental morphology and cytokines and biochemical parameters in mice”** foi submetido à revista *Journal of Physiology and Biochemistry* com fator de impacto (2020): 3. 617.

Effects of different diets and probiotic supplementation during pregnancy on placental morphology and cytokines and biochemical parameters in mice

Nicole Hiller Bondarczuk^a, Natália Perin Schmidt^a, Gabriela Merker Breyer^c, Ana Carolina de Moura^a, Patrícia Molz^a, Alethea Gatto Barshack^b, Amanda de Souza da Motta^c,
Renata Padilha Guedes^{a,b}, Márcia Giovenardi^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author: Dr Márcia Giovenardi
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245/308C
Porto Alegre/RS, 90050-170, Brazil
Tel. +55-51-33308751
e-mail: marciag@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

The placenta is an important transitional organ forming a bridge between mother and fetus during pregnancy. Changes in the intrauterine environment impact the health of the fetus may be influenced by the maternal diet. In the current study, our objective was to investigate the effects of interventions in the maternal diet (caloric restriction and high fat diet) and probiotics supplementation during pregnancy on morphology, biometry and inflammatory mediators in the placenta, in addition to maternal serum biochemical parameters. Female mice received standard (CONT), restrictive (RD) by 30% less than control intake, or high-fat (HFD) diets for 16 weeks, during mating and pregnancy, until the 18th gestation day (GD). During pregnancy, the CONT and HFD groups received by gavage the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LBL5, viable counts were $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, 3 times a week. On the 18th GD the females were euthanized, the trunk blood and placenta was collected. In the blood, serum concentrations of glucose, total cholesterol and triglycerides were analyzed and in the placenta, its morphology and inflammatory cytokines were analyzed. The HFD-fed dams showed an increase in body weight gain from the 13th week of treatment when compared to the RD and CONT groups. During gestation, the HFD group was a significant increase in body weight in the last week of gestation when compared to dams in the RD and CONT+PROB groups. There was no significant difference in the number of pups, fetal resorption, viability rate, inflammatory mediators in the placental, glucose, total cholesterol and triglycerides analyzed in the serum of the mothers who received different diets or in the groups with probiotic supplementation. Regarding placental morphology, HFD and HFD+PROB showed increased thickness of the labyrinth zone when compared to CONT+PROB. These findings suggest that the diets used in this model, as well as probiotic supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* during pregnancy, did not alter the gestacional viability rate, inflammatory mediators in the placenta or the biochemical parameters studied. However, HFD promotes an increase in placental labyrinth zone thickness.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, restrictive diet, high-fat diet, DOHaD, IL-6, TNF- α .

Key Points:

- Maternal restrictive and high-fat diet for 20 week or probiotic supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* during pregnancy did not modification the gestational viability rate, inflammatory mediators in the placenta or the biochemical parameters.
- Maternal high-fat diet change de morphology in the placenta.

1. INTRODUCTION

The importance of maternal diet during pregnancy to neonate health is accentuated by the years of study with the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypotheses, which says that conditions in utero can have a strong effect on health in adulthood [1]. It has been reported that the placenta plays an important role in “programming” the susceptibility to diseases in adult life [2].

The placenta mediated maternal health and fetal development providing the primary nutrient transport, oxygen delivery and hormone production to the fetus [2]. The structure of the murine placenta consists of layers: the outer maternal layer, decidua basalis, with maternal vasculature and decidua cell; the junctional zone with spongiotrophoblast and parietal trophoblast giant cell layer; and the inner layer, labyrinth, with fetal and maternal blood, this layer provides the means to communicate and transfer nutrient, gasses and hormones between mother and fetus [3,4].

Maternal diet can control inflammation at the maternal-fetal interface [5]. Poor nutrition during pregnancy has been linked to low birth weight and the development of metabolic diseases such as obesity [1]. Specifically, the high-fat diet (HFD) has been linked to placental inflammation, cytokine production [6], and increased risk of diabetes mellitus [7]. Therefore, non-pharmacological interventions that minimize this placental inflammatory process have become important [8].

Supplementation with probiotics is a non-pharmacological alternative that can be explored, since evidence shows its anti-inflammatory potential and improves the immune system [9]. Probiotics are live microorganisms that confer favorable health to the host when administered in adequate volume [10]. There are a lot of benefits of consuming

probiotics, such as decreasing cholesterol [11] and lipid levels in serum [12], and anti-inflammatory effects [13]. *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, a novel probiotic candidate used for this study, was isolated from buffalo milk and characterized for its standard probiotics like the strains demonstrated adhesion ability to Caco-2 cells, co-aggregated with *S. aureus* and *E. coli* and maintained cell viability after gastrointestinal simulation in vitro, suggesting their probiotic with potential beneficial effects to health [14]. However, the effects of *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 on improving inflammatory parameters in mice placenta and other benefits are still unknown.

Environmental factors, such as maternal nutrition, act early in the animal's life (fetal life, lactation and early childhood) and are associated with fetal health programming. Furthermore, during pregnancy, the placenta is the only exchange interface between the mother and fetus. Considering that the placenta aims to nourish and control the passage of several substances to the fetus, our objective was to evaluate the effects of interventions in the maternal diet (caloric restriction and high fat diet) and probiotics supplementation during pregnancy on morphology, biometry and inflammatory mediators in the placenta, in addition to maternal serum biochemical parameters.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Ten male and 50 female C57BL/6J mice were obtained from the Animal Housing Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Animals were properly housed and maintained under controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), humidity ($55\pm 5\%$) and illumination (12 h light/dark cycle; lights on at 7 a.m.) conditions. All procedures followed the ethical rules established by the guidelines of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute for Laboratory Animal Research. The Institutional Animal Care and Use Committee of UFCSPA (#273/20) approved this study. All efforts were made in order to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2 Experimental Procedures

On the 60 day of age the females (N=38), weighing between 14-18 g, were divided into 5 groups according to the diet received, and housed 5 per cage, with water *ad libitum*. Male mice, used for mating, were housed 5 per cage with food and water *ad libitum*.

Female mice of the control group (CONT) received standard chow (Nuvital, Curitiba, Brazil) *ad libitum*, with a total energy content of 3.4 kcal/g (63% carbohydrate, 26% protein, 11% fat); the restrictive diet group (RD) had a 30% caloric restriction adjusted according to the consumption of CONT group; the high-fat diet group (HFD) received a chow (Pragsoluções Biociências, Jaú, Brazil) with a total energy content of 5 kcal/g (32.2% carbohydrate, 10,6% protein, 57.2% fat). Females received their diets according to their group for 16 weeks. The composition of the diets (standard and HFD) is described in Table 1.

Then, they were housed with male mice, in a ratio of 3:1, for mating. Confirmation of pregnancy was performed by identifying the copulatory plug in vaginal smears. During pregnancy, the females were kept in individual cages.

Thus, the females were fed with CONT, RD or HFD diets until mating, after the confirmation of pregnancy and throughout gestation, the CONT and HFD groups were divided into 2, to receive probiotics or only the vehicle in which the probiotic was diluted (skim milk), totaling 20 weeks of dietary intervention.

The new probiotic candidate preparation comprised of *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 contained viable counts of 1.3×10^8 cfu/ml. Supplementation with the probiotics was administered 3 times per week by gavage, and the groups that did not receive new probiotic candidates were gavaged with skim milk at the same frequency as the probiotic groups.

The analysis of body weight gain was performed weekly throughout the experiment. The 5 experimental groups were abbreviated according to the diets received: CONT, CONT+PROB, RD, HFD and HFD+PROB.

2.2. Placenta and blood collection

On the 18th day of pregnancy the females were euthanized by decapitation after receiving an average dose of 240 mg/kg of ketamine and 30 mg/kg of xylazine intraperitoneally, and trunk blood was collected in sterile tubes. These blood samples were centrifuged for 10 min, at 1500g and 4 °C. Serum was separated and stored at -80 °C for biochemical analysis. The placenta of each animal was dissected, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C, and other fragments were formalin-fixed for histological analysis. In addition, the numbers of total fetal resorption and placentas with live fetuses were recorded [4].

2.3 Biochemical analysis

The serum concentration of glucose, triglycerides and total cholesterol were analyzed by enzymatic colorimetric method using commercial kits (Labtest, Brazil) according to the manufacturer's specifications [15].

2.4 Placental morphology analysis

A placental fragment was fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Transversal full-face sections, taken from the center of the placental disk and including the full thickness of the decidua and the full thickness of the labyrinth were mounted and stained with hematoxylin and eosin [16]. The total thickness of each placental labyrinth layer was outlined manually and quantified using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 155 USA) [17].

2.5 Cytokines assay

The placenta tissue was homogenized with a RIPA buffer and a protease inhibitors' cocktail, and then centrifuged for 10 minutes at 8,000 rpm. Total protein concentration was determined by Bradford protein assay [18]. Multiplexed immunoassay based on Luminex xMAP technology was performed using Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels for measuring iInterleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and

tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Assays were performed according to the manufacturer's instructions [19].

2.7 Statistical analyses

The normality of the data was tested by Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison test. Statistical analyses were made using GraphPad Prism 9 (La Jolla, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

Table 2 shows the characteristics of mice pregnancy. There was no significant difference in the number of pups, fetal resorption, and viability rate when compared dams from control (CONT), control diet plus probiotics (CONT+PROB), restrictive diet (RD), high-fat diet (HFD) and high-fat diet plus probiotics (HFD+PROB) groups.

Regarding body weight gain (Figure 2A), we observed a significant increase in body weight gain from the 13th to 17th week of diet only in the HFD group when compared to RD ($p < 0.001$) and CONT ($p < 0.01$). During pregnancy (Figure 2B), we observed a significant increase in body weight in the last week of gestation of the HFD when compared to dams in the RD and CONT+PROB groups ($p < 0.05$).

The Figure 3 shows the serum biochemical parameters including glucose (A), total cholesterol (B), and triglycerides (C) of dams fed with standard (CONT), standard plus probiotics (CONT+PROB), restrictive (RD), high-fat (HFD) and high-fat plus probiotics (HFD+PROB) diets. We did not find significant differences among the groups studied in relation to the biochemical parameters ($p > 0.05$).

In the analysis of cytokines in the placental tissue, we did not find any significant difference when comparing the dams of the studied groups (Figure 4).

The thickness of the labyrinth zone was significantly increased ($[F(4,18)=3615$; $p=0.024$) in the HFD ($p=0.040$) and HFD+PROB ($p=0.040$) groups when compared to

CONT+PROB.

4. DISCUSSION

Our findings showed a significant increase in body weight gain in the group of females fed HFD from the 13th week of treatment. In the period of pregnancy, when probiotic supplementation was administered, we found that weight gain occurred only in the third week of gestation and was greater only in the HFD group. However, a previous study (20) with Balb/c mice on day 22 postpartum showed no difference in weight gain with mothers submitted to a restrictive and hypercaloric diet.

Differently from our findings, other studies in the pre-gestational, gestational and lactation periods demonstrated differences in the biochemical parameters in mice fed with HFD and with cafeteria (CAF) diet [21,22]. Indeed, studies with male mice in HFD [23] or rats CAF-fed [24] confirm changes in the body weight and weight gain, and in the concentration of glucose, triglycerides and total cholesterol in relation to the standard diet group. It should be noted that the composition of obesogenic diets used in animal models is highly variable and that most studies are in males, which may explain different results. In addition, we analyzed these parameters at the end of pregnancy, period of discharge metabolic demand due to the physiological changes that the maternal organism undergoes to ensure fetal development and growth.

Another important aspect of our results was to demonstrate that RD, HFD and probiotic supplementation groups showed no change in the number of fetuses per fetal resorption and in the viability rate. Our data corroborate those presented by [25, 26, 27] who also found no differences in the number of fetuses or fetal resorption when HFD, RD or probiotic supplementation was administered.

The placenta is a highly adaptable organ, it has a high degree of plasticity and is able to promote changes in the microenvironment whenever it changes. The purpose of this adaptation is to promote the protection and well-being of the fetus [11]. Some studies have analyzed the impact of different types of diet on placental histomorphology. Rats HFD-fed during pregnancy had a decrease in the placenta junctional zone, but no change in the placental labyrinth zone [28,29]. On the other hand, Sprague-Dawley rats fed an

obesogenic diet in the same period showed a marked decrease in the maze area compared to the standard diet group [30]. Besides, a previous study by [31] did not report any difference in the placental labyrinth zone when comparing HFD mothers with the ones who received a standard diet. In the present study, we showed that our diet model or probiotic supplementation increased the thickness of the placental labyrinth zone. Our results compared the effects of HFD before and during pregnancy, but probiotic supplementation only occurred during pregnancy.

When we analyzed the RD-fed dams, we found that no layer of the placenta was altered. Similar findings had already been reported in other studies with mice fed with 50% calorie restriction throughout gestation (32) or three weeks before mating until day 11.5 of gestation that showed preservation of the labyrinth zone [33, 34]. This set of evidence allows us to suggest that there was an adaptation to restricted food.

The placenta is the primary interface between the maternal and fetal environments and selectively transfers nutrients and oxygen to the fetus, removing waste. This organ provides a semipermeable bridge for inflammatory molecules present in the maternal circulation which may influence fetal development [35, 36, 37]. It also contains lipids as important precursors of hormones and inflammatory mediators that support pregnancy, so maternal dyslipidemia can impair placental function and impair pregnancy (38).

According to our findings, neither diets offered, nor supplementation with probiotics affected the concentration of cytokines in the placenta. A similar study with females HFD (60%) and RD (30% less fat) fed for 8 weeks before pregnancy also showed no changes in placental cytokines from its inflammation [39]. However, other published studies have conflicting results where dams fed with HFD showed increased TNF- α and IL-6 in serum and placenta [31] and increased mRNA expression of IL-1 β [31]. Probiotic supplementation reduced placental TNF- α mRNA at D12 and IL-10 mRNA at D19 in HFD-treated dams [40].

5. CONCLUSIONS

In summary, nutritional interventions during the reproductive period should always be used with caution. Our findings suggest that high-fat and calorie-restricted diets, as well

as probiotic supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* during pregnancy, they do not cause alterations in the gestational viability rate, in the inflammatory cytokines in the placenta and in the studied serum biochemical parameters. However, HFD promotes an increase in the thickness of the placental labyrinth zone. It is important to highlight differences such as composition, time of receiving the diet, strains of probiotics, being used as supplements and the species of the animal model.

Funding: This study was funded by PROAP/UFCSPA (Programa de Apoio à Pós-Graduação/Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval: The Institutional Animal Care and Use Committee of UFCSPA (#273/20) approved this study.

Author contribution: The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

REFERENCES

1. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007 May;261(5):412-7. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x. PMID: 17444880.G.J.
2. Burton GJ, Fowden AL. Review: The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta.* 2012 Feb;33 Suppl:S23-7. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.013. Epub 2011 Dec 10. PMID: 22154688.
3. Hosseini MS, Ali-Hassanzadeh M, Nadimi E, Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ghareesi-Fard B. Stereological study of the placental structure in abortion-prone mice model (CBA/J×DBA/2J). *Ann Anat.* 2020 Jul;230:151508. doi: 10.1016/j.aanat.2020.151508. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32173562.
4. Rong Li, Christian Lee Andersen, Lianmei Hu, Zidao Wang, Yuehuan Li, Tamas Nagy, Xiaoqin Ye, Dietary exposure to mycotoxin zearalenone (ZEA) during post-implantation adversely affects placental development in mice, *Reproductive Toxicology*, Volume 85, 2019, Pages 42-50, ISSN 0890-6238, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.01.010>.
5. Lim R, Barker G, Wall CA, Lappas M. Dietary phytochemicals curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2013 Jul;19(7):451-62. doi: 10.1093/molehr/gat015. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23475986.
6. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol Reprod.* 2014 Jun;90(6):130. doi: 10.1095/biolreprod.113.117259. Epub 2014 May 14. PMID: 24829026.
7. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jun;81(6):1390-6. doi: 10.1093/ajcn/81.6.1390. PMID: 15941892.
8. . Upadhyay A, Anjum B, Godbole NM, Rajak S, Shukla P, Tiwari S, Sinha RA, Godbole MM. Time-restricted feeding reduces high-fat diet associated placental inflammation and limits adverse effects on fetal organ development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jun 25;514(2):415-421. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.154. Epub 2019 May 1. PMID: 31053302.
9. Ghadimi D, Fölster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, Schrezenmeir J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology.* 2008;213(8):677-92. doi: 10.1016/j.imbio.2008.02.001. Epub 2008 Apr 2. PMID: 18950596.

10. Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO) (2001) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria; Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Rome, FAO/WHO. Available in: <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/7c102d95-2fd5-5b22-8faf-f0b2e68dfbb6/>. Access in: 15.01.2022
11. Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online*. 2012 Jul;25(1):68-89. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.03.017. Epub 2012 Apr 5. PMID: 22560117.
12. Kim SJ, Park SH, Sin HS, Jang SH, Lee SW, Kim SY, Kwon B, Yu KY, Kim SY, Yang DK. Hypocholesterolemic Effects of Probiotic Mixture on Diet-Induced Hypercholesterolemic Rats. *Nutrients*. 2017 Mar 16;9(3):293. doi: 10.3390/nu9030293. PMID: 28300786; PMCID: PMC5372956.
13. Kirpich IA, Feng W, Wang Y, Liu Y, Beier JI, Arteel GE, Falkner KC, Barve SS, McClain CJ. Ethanol and dietary unsaturated fat (corn oil/linoleic acid enriched) cause intestinal inflammation and impaired intestinal barrier defense in mice chronically fed alcohol. *Alcohol*. 2013 May;47(3):257-64. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.01.005. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23453163; PMCID: PMC3617059.
14. . Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof RM, Hassan FA. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. *Food Chem*. 2012 Nov 15;135(2):356-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.120. Epub 2012 May 1. PMID: 22868099.
15. de Melo, T.S. et al. Ferulic acid lowers body weight and visceral fat accumulation via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory changes in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2017, v. 50, n. 1 [Accessed 27 March 2022] , e5630. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1414-431X20165630>>. Epub 05 Jan 2017. ISSN 1414-431X. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165630>.
16. . Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, de Souza da Motta A. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021 Apr;13(2):468-483. doi: 10.1007/s12602-020-09700-4. PMID: 32829420.
17. Williams L, Burgos ES, Vuguin PM, Manuel CR, Pekson R, Munnangi S, Reznik SE, Charron MJ. N-Acetylcysteine Resolves Placental Inflammatory-Vasculopathic Changes in

- Mice Consuming a High-Fat Diet. *Am J Pathol.* 2019 Nov;189(11):2246-2257. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.010. Epub 2019 Aug 17. PMID: 31430466; PMCID: PMC6892186.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
 19. Li R, Zhao F, Diao H, Xiao S, Ye X. Postweaning dietary genistein exposure advances puberty without significantly affecting early pregnancy in C57BL/6J female mice. *Reprod Toxicol.* 2014 Apr;44:85-92. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.12.003. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24365114; PMCID: PMC4004695.
 20. Gauthier MF, de Andrade AA, Fisch J, Feistauer V, Morás AM, Reinhardt LS, de Moura AC, Moura DJ, de Almeida S, Guedes RP, Giovenardi M. Dietary interventions in mice affect oxidative stress and gene expression of the Prlr and Esr1 in the adipose tissue and hypothalamus of dams and their offspring. *J Physiol Biochem.* 2022 Feb;78(1):271-282. doi: 10.1007/s13105-021-00862-5. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35023022.
 21. Ohshima M, Coq JO, Otani K, Hattori Y, Ogawa Y, Sato Y, Harada-Shiba M, Ihara M, Tsuji M. Mild intrauterine hypoperfusion reproduces neurodevelopmental disorders observed in prematurity. *Sci Rep.* 2016 Dec 20;6:39377. doi: 10.1038/srep39377. PMID: 27996031; PMCID: PMC5171836.
 22. Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Feb 8;431(2):258-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.121. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23313485.
 23. Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Rokana N, Kumar R, Raghavan S, Soundarajan A, Grover S, Batish VK, Mohan V, Balasubramanyam M. 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 Feb;57(1):279-295. doi: 10.1007/s00394-016-1317-7. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27757592.
 24. Neto J, Jantsch J, de Oliveira S, Braga MF, Castro LFDS, Diniz BF, Moreira JCF, Giovenardi M, Porawski M, Guedes RP. DHA/EPA supplementation decreases anxiety-like behaviour, but it does not ameliorate metabolic profile in obese male rats. *Br J Nutr.* 2021 Oct 4:1-11. doi: 10.1017/S0007114521003998. Epub ahead of print. PMID: 34605386.
 25. Hartil K, Vuguin PM, Kruse M, Schmuell E, Fiallo A, Vargas C, Warner MJ, Durand JL, Jelicks LA, Charron MJ. Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatr Res.* 2009

- Oct;66(4):368-73. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181b33375. PMID: 19581843; PMCID: PMC2795789.
26. Tao Y, Huang F, Zhang Z, Tao X, Wu Q, Qiu L, Wei H. Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 ameliorates pathobiont-induced miscarriage through bacterial antagonism and Th1-Th2 modulation in pregnant mice. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Jun;104(12):5493-5504. doi: 10.1007/s00253-020-10609-9. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32314005.
 27. Gurmini, Jocemara et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [online]. 2005, v. 41, n. 4 [Acessado 27 Março 2022] , pp. 271-278. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000400009>>. Epub 25 Out 2005. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000400009>.
 28. Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*. 2012 Apr;33(4):233-43. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.026. Epub 2012 Jan 28. PMID: 22284666; PMCID: PMC3288880.
 29. Mark, P., Sisala, C., Connor, K., Patel, R., Lewis, J., Vickers, M., Sloboda, D. (2011). A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2(1), 63-70. doi:10.1017/S2040174410000681
 30. Tim Van Mieghem, Rita van Bree, Erik Van Herck, Jan Deprest, and Johan Verhaeghe Insulin-like growth factor-II regulates maternal hemodynamic adaptation to pregnancy in rats *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2009 297:5, R1615-R1621
 31. Williams L, Burgos ES, Vuguin PM, Manuel CR, Pekson R, Munnangi S, Reznik SE, Charron MJ. N-Acetylcysteine Resolves Placental Inflammatory-Vasculopathic Changes in Mice Consuming a High-Fat Diet. *Am J Pathol*. 2019 Nov;189(11):2246-2257. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.010. Epub 2019 Aug 17. PMID: 31430466; PMCID: PMC6892186.
 32. Harper JL, Caesar GA, Pennington KA, Davis JW, Schulz LC. Placental changes caused by food restriction during early pregnancy in mice are reversible. *Reproduction*. 2015 Sep;150(3):165-72. doi: 10.1530/REP-15-0010. PMID: 26060317; PMCID: PMC4674383.
 33. Van Gronigen Case G, Storey KM, Parmeley LE, Schulz LC. Effects of maternal nutrient restriction during the periconceptional period on placental development in the mouse. *PLoS One*. 2021 Jan 14;16(1):e0244971. doi: 10.1371/journal.pone.0244971. PMID: 33444393; PMCID: PMC7808591.

34. Schulz LC, Schlitt JM, Caesar G, Pennington KA. Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol Reprod.* 2012 Nov 16;87(5):120. doi: 10.1095/biolreprod.112.103218. PMID: 22993381; PMCID: PMC3509780.
35. Chen HJ, Gur TL. Intrauterine Microbiota: Missing, or the Missing Link? *Trends Neurosci.* 2019 Jun;42(6):402-413. doi: 10.1016/j.tins.2019.03.008. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31053242; PMCID: PMC6604064.
36. Gur TL, Shay L, Palkar AV, Fisher S, Varaljay VA, Dowd S, Bailey MT. Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring. *Brain Behav Immun.* 2017 Aug;64:50-58. doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.021. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28027927.
37. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda).* 2005 Jun;20:180-93. doi: 10.1152/physiol.00001.2005. PMID: 15888575.
38. Louwagie EJ, Larsen TD, Wachal AL, Baack ML. Placental lipid processing in response to a maternal high-fat diet and diabetes in rats. *Pediatr Res.* 2018 Mar;83(3):712-722. doi: 10.1038/pr.2017.288. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29166372; PMCID: PMC5902636.
39. Connor KL, Kibschull M, Matysiak-Zablocki E, Nguyen TTN, Matthews SG, Lye SJ, Bloise E. Maternal malnutrition impacts placental morphology and transporter expression: an origin for poor offspring growth. *J Nutr Biochem.* 2020 Apr;78:108329. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108329. Epub 2020 Jan 8. PMID: 32004932.
40. Kate Larson, Danielle Krout, Travis Alvine, Huawei Zeng, Amy Bundy, David Klurfeld, Gloria Solano-Aguilar, Michael Bukowski, Simin Meydani, James Roemmich, Probiotic Supplementation Regulates Placental and Fetal Development in C57BL6/J Mice (P20-008-19), *Current Developments in Nutrition*, 3, Issue Supplement_1, June 2019, nzz040.P20-008-19, <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz040.P20-008-19>

FIGURES LEGENDS

Table 1. Nutritional composition of the standard and high-fat diets.

Table 2. Number of pups, fetal resorption, and viability rate of the dams on the 18th day of pregnancy fed with standard (CONT, n=8), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive diet (RD, n=9), high-fat (HFD, n=7) and high-fat plus probiotic (HFD+PROB, n=6). Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test.

Figure 1. Experimental procedure scheme.

Figure 2. Body weight gain of females during treatment weeks (A) and during pregnancy (B). Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. * when compared to CONT, ** when compared to RD.

Figure 3. Serum glucose (A), total cholesterol (B) and triglycerides (C) parameters of the dams on the 18th day of pregnancy fed with standard (CONT, n=8), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive (RD, n=9), high-fat (HFD, n=7) and high-fat plus probiotic (HFD+PROB, n=6) diets. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test.

Figure 4. Analysis of pro-inflammatory cytokines in the placental tissue of the dams on the 18th day of pregnancy fed with standard (CONT, n=6), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive (RD, n=8), high-fat (HFD, n=10) and high-fat plus probiotic (HFD+PROB, n=6) diets. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. Abbreviations: interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin 1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

Figure 5. The thickness of the labyrinth zone of the placenta (18th day of gestation) of dams fed standard (CONT, n=6), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive diet (RD, n=8), high fat (HFD, n=10) and high fat plus probiotic (HFD +PROB, n=6) diet. Data are expressed as mean \pm SEM compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. * when compared to CONT+PROB.

Table 1. Nutritional composition of the standard and HFD diets.

INGREDIENTS (g/kg diet)	Standard diet	HFD
Carbohydrates	545.0	1722,8
- sucrose		400.0
- corn starch		922.8
- dextrinized starch		360.0
Net protein	225.0	
- casein		560.0
Ether extract		
- lard	42.0	27000.0
- soybean oil		360.0
Fibrous matter	70.0	0.0
AIN-93 mineral mix	90.0	0.0
AIN-93 vitamin mix	12.0	40.0
Amino acids	16.0	7.2
TOTAL	1000	1000

Table 2. Number of pups, fetal resorption, and viability rate per dam, fed a control diet (CONT), control diet and probiotics (CONT+PROB), restrictive diet (RD), high-fat diet (HFD), and high-fat diet and probiotics (HFD+PROB).

GROUPS	Number of pups per dam	Fetal resorption	Viability rate
CONT (n=7)	8.250 ± 0.526	0.200 ± 0.200	0.876 ± 0.045
CONT + PROB (n=5)	7.200 ± 0.969	0.400 ± 0.244	0.951 ± 0.030
RD (n=9)	6.111 ± 0.454	0.888 ± 0.351	0.907 ± 0.041
HFD (n=10)	7.000 ± 0.471	0.400 ± 0.163	0.949 ± 0.021
HFD + PROB (n=6)	7.500 ± 0.428	0.600 ± 0.400	0.960 ± 0.040

Data expressed as mean ± SEM. One-Way analysis of variance followed by Bonferroni multiple comparison test.

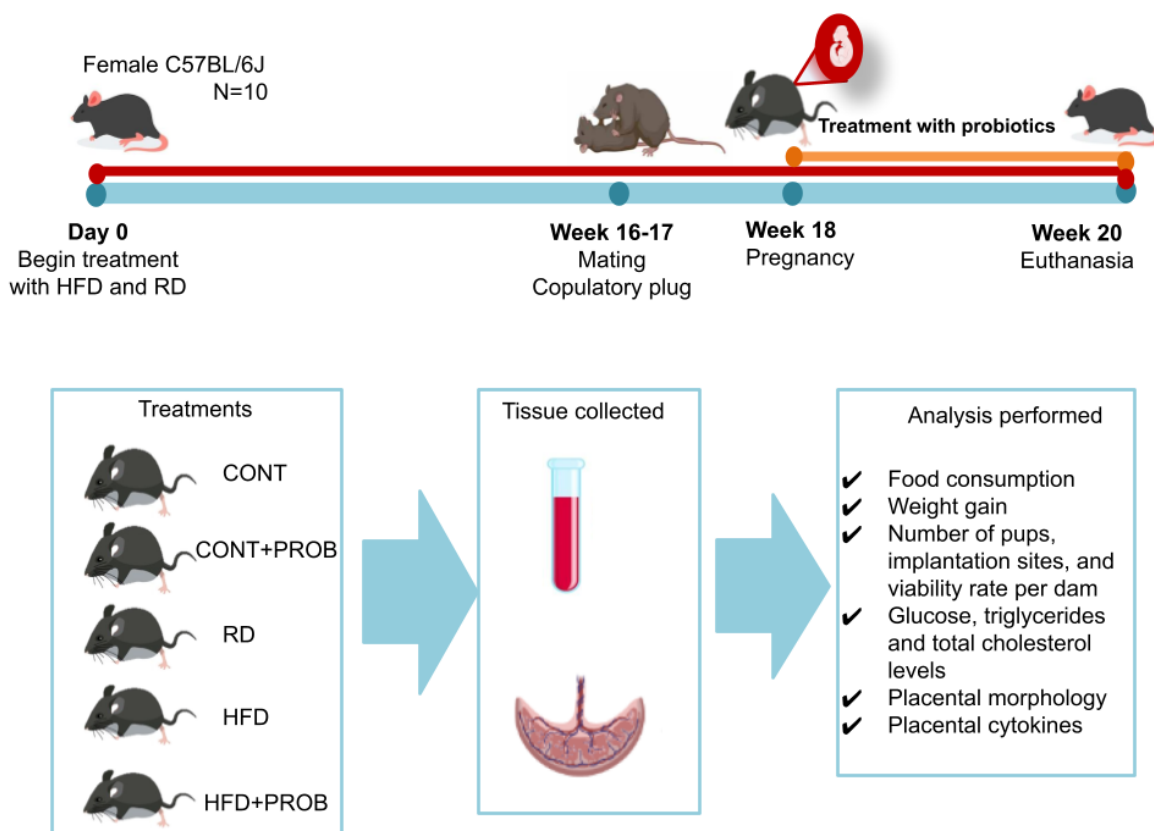
Figure 1. Experimental procedure scheme

Figure 2. Body weight gain of females during treatment weeks (A) and during pregnancy (B). Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. * when compared to CONT, ** when compared to RD.

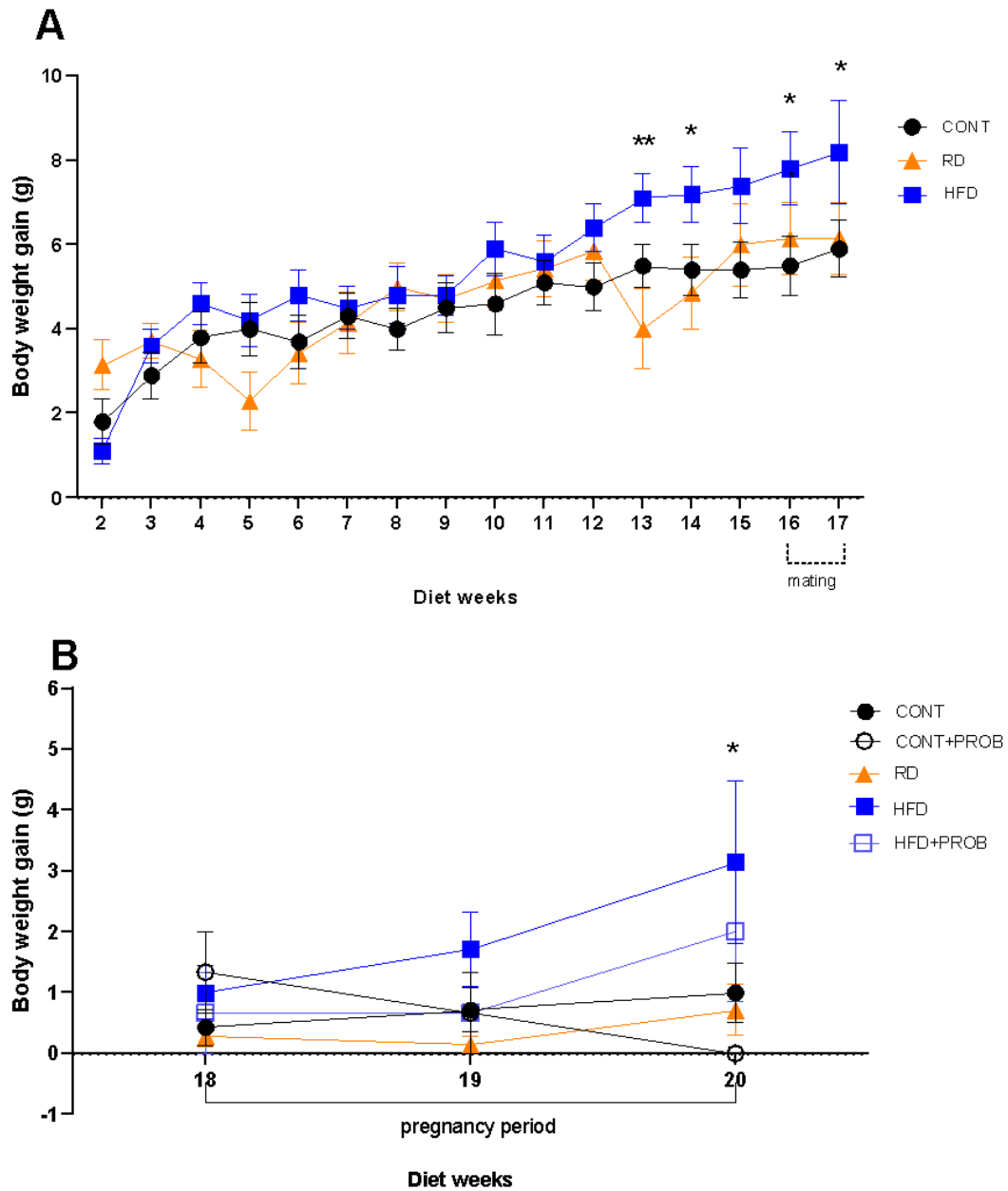


Figure 3. Serum glucose (A), total cholesterol (B) and triglycerides (C) parameters of the dams on the 18th day of pregnancy fed with standard (CONT, n=8), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive (RD, n=9), high-fat (HFD, n=7) and high-fat plus probiotic (HFD+PROB, n=6) diets. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test.

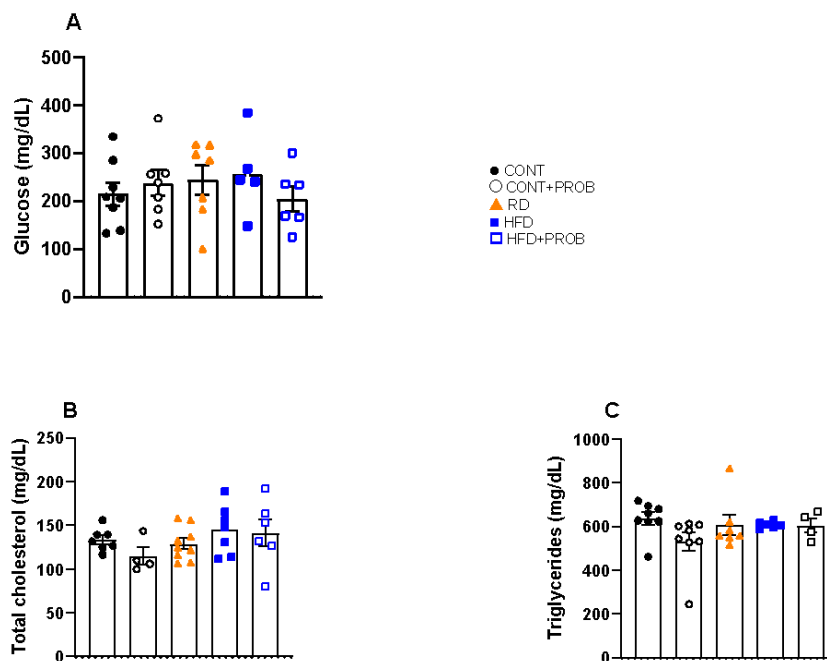


Figure 4. Analysis of pro-inflammatory cytokines in the placental tissue of the dams on the 18th day of pregnancy fed with standard (CONT, n=6), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive (RD, n=8), high-fat (HFD, n=10) and high-fat plus probiotic (HFD+PROB, n=6) diets. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. Abbreviations: interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin 1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

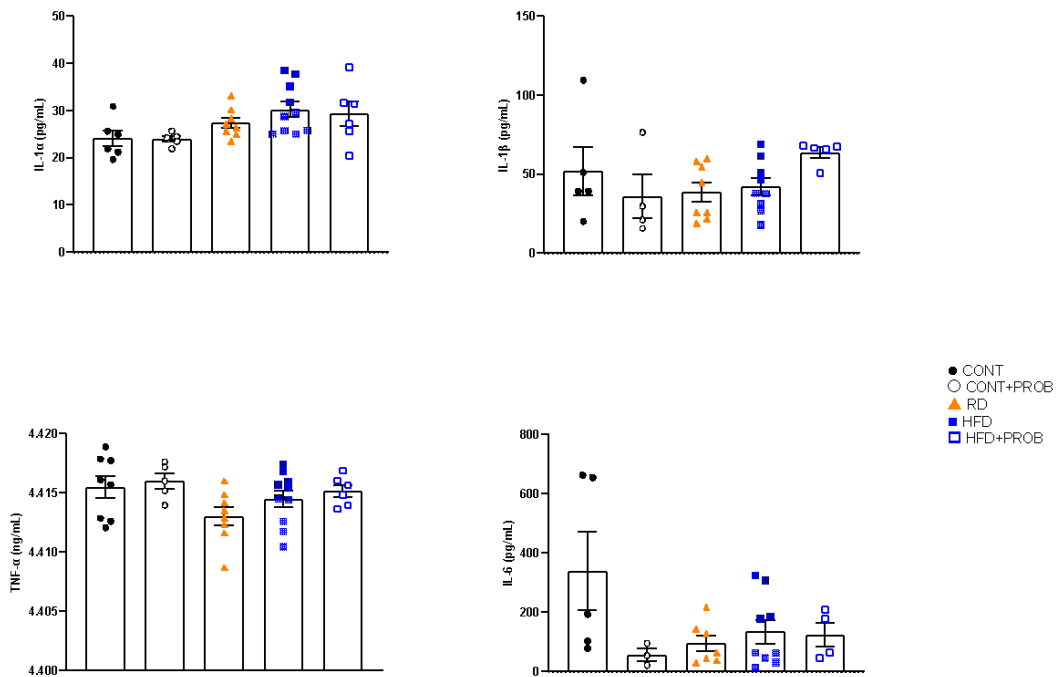
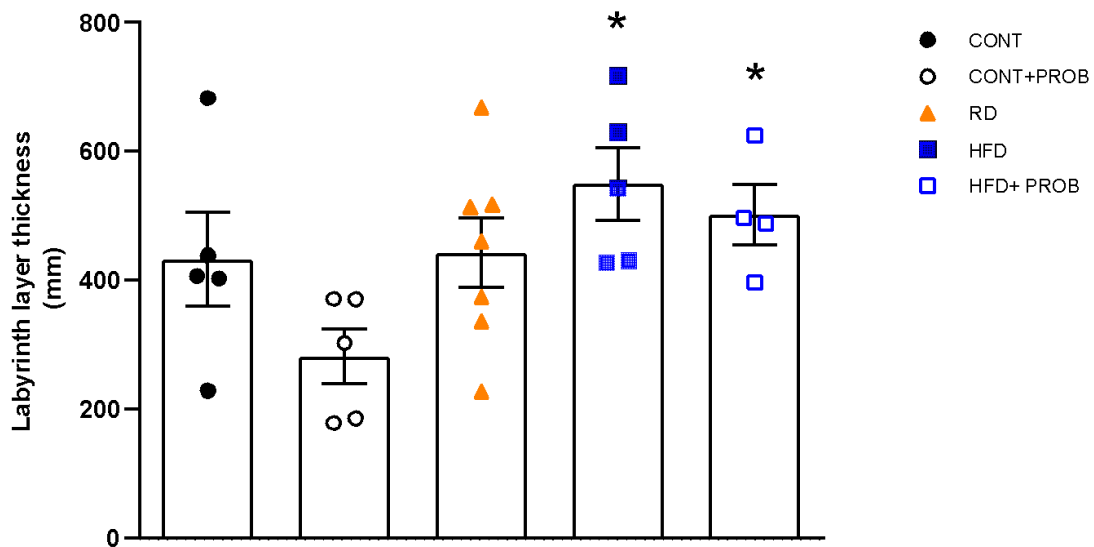


Figure 5. The thickness of the labyrinth zone of the placenta (18th day of gestation) of dams fed standard (CONT, n=6), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=5), restrictive diet (RD, n=8), high fat (HFD, n=10) and high fat plus probiotic (HFD +PROB, n=6) diet. Data are expressed as mean \pm SEM compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. * when compared to CONT+PROB.



CONCLUSÕES

Na literatura encontramos uma heterogeneidade nas metodologias utilizadas, tais como: diferentes tempos de tratamento, composições, quantidades, modelos animais e uma ampla variedade de cepas bacterianas testadas como potenciais probióticos.

Em conclusão, esses achados sugerem que as dietas utilizadas neste modelo, assim como a suplementação probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 durante a gestação, não impactaram os mediadores inflamatórios nos parâmetros placentários e bioquímicos analisados. Por isso, interações materno-fetais carecem de mais estudos para que seus mecanismos sejam melhor elucidados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WANG, J., et al. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. **Antioxid Redox Signal.** 17 (2):p.282-301. 2012
2. ROSS MG, DESAI M. Developmental programming of appetite/satiety. **Ann Nutr Metab.**; 64 Suppl 1:p.36-44. 2014
3. BALE TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nat Rev Neurosci.** 16(6)p:332-44. 2015
4. FOWDEN AL, MOORE T. Maternal-fetal resource allocation: co-operation and conflict. **Placenta.** Nov;33 Suppl 2:e11-5. 2012
5. NEEL JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? **Am J Hum Genet.** 14(4):p.353-62. 1962
6. RAVELLI GP, STEIN ZA, SUSSER MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med.**; 295(7):p.349-53. 1976
7. BARKER DJ, WINTER PD, OSMOND C, MARGETTS B, SIMMONDS SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet.** 2(8663):p.577-80. 1989
8. SILVEIRA PP, PORTELLA AK, GOLDANI MZ, BARBIERI MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr (Rio J).** 83(6):p.494-504. 2007
9. KHAZIPOV R, LUHMANN HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. **Trends Neurosci.** 29(7):p.414-418. 2006
10. CREWS F, HE J, HODGE C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol Biochem Behav.** 86(2):p.189-99. 2007
11. CHEN HJ, GUR TL. Intrauterine Microbiota: Missing, or the Missing Link? **Trends Neurosci.** 42(6):p.402-413. 2019
12. MATHERS JC. Early nutrition: impact on epigenetics. **Forum Nutr.**; 60:p.42-48. 2007
13. EGGER G, LIANG G, APARICIO A, JONES P.A, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature.** P.457-63. 2004
14. AGARWAL P, MORRISSEAU TS, KERELIUK SM, DOUCETTE CA, WICKLOW BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic

mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. **Crit Rev Clin Lab Sci.** 55(2): p. 71-101. 2018

15. YUANYUAN.L Epigenetic Mechanisms Link Maternal Diets and Gut Microbiome to Obesity in the Offspring. **Frontiers in Genetics** 9. 2018

16. SIMMONS DG, FORTIER AL, CROSS JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. **Dev Biol.**;304(2): p.567-78. 2007

17. REYNOLDS L.P, ET AL. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **Int J Dev Biol.**; 54:p.355-66. 2010

18. BURTON, G.J., KAUFMANN, P., HUPPERTZ, B. Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Neill, J.D., et al. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; p.189-243. 2006.

19. A. MALASSINÉ, J.-L. FRENDON, D. EVAIN-BRION, A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model, **Human Reproduction Update**, Volume 9,p. 531–539. 2003

20. ROSSANT, J., CROSS, J. Placental development: Lessons from mouse mutants. **Nat Rev Genet** 2, 538. 2001.

21. MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. Embriologia Básica. Elsevier, v. 8, p. 76-78, 2013.

22. CONNOR K.L, et al. Maternal malnutrition impacts placental morphology and transporter expression: an origin for poor offspring growth. **J Nutr Biochem.** .2020

23. SANDOVICI I, HOELLE K, ANGIOLINI E, CONSTÂNCIA M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. **Reprod Biomed Online**: p. 68-89. 2012

24. MÉRICI DE PAULA. T Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação de camundongos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. (UFMG). 2017.

25. CROY, A., YAMADA, A.T., DEMAYO, F.J., ADAMSON, S.L.. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. London: **Elsevier**; 808p. 2014

26. LEWIS et al. The placental exposome: placental determinants of fetal adiposity and postnatal body composition. **Ann. Nutr. Metab** 63:p.2008-2015. 2013

27. CATALANO, P.M, et al Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. **Diabetes Care** 32: p.1076-1080. 2009.

- 28.. CHALLIER, J.C, Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta** 29: p. 274-281. 2008.
29. LEON-GARCIA S.M. et al. Maternal obesity and sex-specific differences in placental pathology. **Placenta**_38: p. 33-40. 2016.
30. YAN MA, et al. Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonaryvascularity and angiogenic factor expression in the ewe._**Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 299: p. 249-258. 2010.
- 31.CAITLIN S. et al. Altered Placental Function of 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 Knockout Mice. **Endocrinology**_150: p.1287–1293. 2009.
32. VAUGHAN, A. B et al. Environmental regulation of placental phenotype: implications for fetal growth. **Reproduction, Fertility and Development** 24: p.80-96. 2011.
33. KING,V. et al. The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. **Placenta** 34: p.1087-1090. 2013.
34. RACHAEL, C. CREW, B. J. W., PETER J. MARK Maternal obesity induced by a 'cafeteria' diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. **Placenta** 39:p. 33-40. 2016.
35. FLEGAL, K.M, CARROLL MD, et al. Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014. **JAMA** 315:p. 2284–2291. 2016.
36. SOUZA. L. Em 2030, os brasileiros poderão estar com excesso de peso. [agenciabrasil.ebc.com.br](https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-01/em-2030-68-dos-brasileiros-poderao-estar-com-excesso-de-peso). 2022. Disponível em <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-01/em-2030-68-dos-brasileiros-poderao-estar-com-excesso-de-peso> Acesso em: 16.03.2022
37. FOROUZANFAR, M.H, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years." **N Engl J Med**. 377: p.13–27. 2017.
38. REIS, M.L. Relatório da ONU; ano pandêmico marcado por aumento da fome no mundo. [unicef.org](https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/relatorio-da-onu-ano-pandemico-marcado-por-aumento-da-fome-no-mundo). 2021. Disponível em <https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/relatorio-da-onu-ano-pandemico-marcado-por-aumento-da-fome-no-mundo> Acesso em: 16.03.2022
39. BAETEN, J.M, LAMBE, B. E Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. **Am J Public Health** 91:p. 436-440. 2001.

40. WHITAKER, R.C. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. **Pediatrics** 114:p. 29-36. 2004.
41. CURHAN G.C., et al. Birth weight and adult hypertension and obesity in women. **Circulation** 94: p.1310-1315.1996.
42. MARTIN-GRONERT, et al. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring.v. **Biochem Soc Trans** 34: p.779-782. 2006.
43. LÓPEZ-LLUCH, G. N., P. Calorie restriction as an intervention in ageing. **The Journal of Physiology** v. 594: p. 2043–2060. 2016.
44. AUCOTT SW, D. P., NORTHINGTON FJ. Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction. **J Perinatol** 24: p. 435–440. 2004.
45. LUTTER M, et al. Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. **J Neurosci** 28: p. 3071–3075. 2008.
46. KITAMURA, T, SUGIYAMA H. Dietary restriction increases hippocampal neurogenesis by molecular mechanisms independent of NMDA receptors. **Neurosci Lett** 393:p. 94-96. 2006.
47. STONE. V, et al., Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood.**The Journal of Nutritional Biochemistry** 67:p. 138-148. 2019.
48. FUNSTON, R. N. L., D. M.; VONNAHME, K. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production. **Journal of Animal Science**, 88. 2010.
49. WATKINS, A. J. Maternal nutrition modifies trophoblast giant cell phenotype and fetal growth in mice. **Reproduction** 149: p. 563–575. 2015.
50. TSUNEDA, P. Efeitos da nutrição materna sobre o desenvolvimento e performance reprodutiva da prole de ruminantes. **Revista Investigação** 16: p.56–61. 2017.
51. DUMORTIER, O, et al Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. **Diabetologia** 50: p. 2495–2503. 2007.
52. FERREIRA. A et al. Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. **Neurobiology of Learning and Memory** 155: p. 197–207. 2018

53. PRATCHAYASAKUL W, K. S, et al. Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. **Life Sci** 88: p.619–627. 2011.
54. ABILDGAARD A, et al. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. **Psychoneuroendocrinology** 36: p. 623–633. 2011.
55. GAILLARD, R., et al. Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. **Obesity** 21:p. 1046–1055. 2013.
56. LARAIA, B. A., BODNAR, L. M., AND SIEGA-RIZ, A. M. Pregravid body mass index is negatively associated with diet quality during pregnancy. **Public Health Nutr** 10:p. 920–926. 2007.
57. ASHINO, N. G., et al Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **J. Nutr. Biochem** 23: p. 341-348. 2012.
58. MORRIS, M., CHEN, H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. **Int J Obes** 33:p. 115–122. 2009.
59. SABEN, J, et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. **Placenta** 35:p. 171-177. 2014.
60. ASHINO, N.G. et al Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver, **J. Nutr. Biochem**, 23: p. 341–348. 2012.
61. BATISTA, K.S, et al. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **Br J Nutr** 119: p.30-41. 2018.
62. KIM KA, et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PLoS One**. 2012.
63. THORNBURG, K. L., AND MARSHALL, N. The placenta is the center of the chronic disease universe. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 213: p. 14–20. 2015.
64. CAROLYN A. THOMSON AND KATHY D. MCCOY. Infographic: Maternal Microbiota Has Lasting Effects on Offspring. **The Scientist**. 2021.
65. KING V, et al. Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. **Endocrinology** 154: p 2514–2524. 2013.

66. YOKOMIZO H. et al. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 306: p.1163–1175. 2014.
67. LUMEY L.H. Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. **Placenta** 19: p.105–111. 1998.
68. HARPER J.L., et al. Placental changes caused by food restriction during early pregnancy in mice are reversible. **Reproduction.** 2015.
69. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of pro-biotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina
70. SCHREZENMEIR, J. D. V., M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—Approaching a definition. **Am. J.Clin. Nutr** 73: p.361–364. 2001.
71. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30, May 1; London Ontario, Canada; 2002.
72. VANDENPLAS, Y et al. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria** 91: p 6-21. 2015.
73. SANCHÉZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Mol. Nutr. Food Res.** 61. 2017.
74. GHADIMI D, et al. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. **Immunobiology.** 213:p. 677---692. 2008.
75. Pothuraju, R. S. et al. Influence of milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* ncdc 17 alone and in combination with herbal ingredients on diet induced adiposity and related gene expression in c57bl/6j mice. **Food Funct.** 6: p.3576–3584. 2015.
76. Allen SJ, et al. Dietary supplementation with lactobacilli and bifidobacteria is well tolerated and not associated with adverse events during late pregnancy and early infancy. **J Nutr.** 140:p. 483-488. 2010.
77. RAUTAVA S, C. M., SALMINEN S, ISOLAURI E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neonatology** 102: p.178-184. 2012.
78. YADAV, R., KHAN, S.H., MADA, S.B. et al. Consumption of Probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia,

Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics & Antimicro. Prot.** 11: p. 509–518. 2019.

79. SWARTWOUT, B. AND X. M. LUO. Implications of Probiotics on the Maternal-Neonatal Interface: Gut Microbiota, Immunomodulation, and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology** 9. 2018.

80. LARSON K, K. D., ALVINE T, et al. Probiotic Supplementation Regulates Placental and Fetal Development in C57BL6/J Mice. **Curr Dev Nutr**, 3. 2019.

81. KAKTCHAM P.M, Z. N., TCHOUANGUEP F.M, EL-SODA M, CHOUDHARY M.I. Antimicrobial and safety properties of Lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. **Sci Pharm** 80:p. 189–203. 2012.

82. VIJAYA KUMAR B, V. S., REDDY O.V.S Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. **J Food Sci Technol** 52:p. 6112–6124. 2015.

83. BREYER, G. M., ARECHAVALETA, N.N., SIQUEIRA, F.M. et al. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. **Probiotics & Antimicro. Prot.** 13: p. 468–483.2021.

ANEXOS**ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Nº 273/20**



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Rua Sarmiento Leite, 246 - Fones: 0 xx 51 3303 0000 - Fax: 0 xx 51 3303 8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 273/20

2) DATA DO PARECER: 10 de junho de 2020 Parecer 701/20

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise de intervenções na dieta, em diferentes fases do desenvolvimento, através da avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Giovenardi

5) RESUMO DO PROJETO:

O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos de intervenções na dieta (restrição calórica, probióticos e dieta hipercalórica), em diferentes fases da vida do animal, através da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos. A hipótese central deste estudo é que a restrição calórica e a administração de probióticos no período gestacional e lactacional poderão proteger a interface materno-fetal, além de prevenir na vida adulta e na senescência, o aparecimento de alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pela alimentação hipercalórica ao longo da vida. Para testar essa hipótese, este projeto propõe a utilização de camundongos machos (n=110 e fêmeas (n 100) da linhagem C57BL/6J, mantidos no biotério da UFCSPA, que serão divididos em 4 experimentos. Para os experimentos I e II, as fêmeas (n=10/grupo) receberão um dos 5 diferentes tipos de dieta: dieta controle (CONT, dieta padrão, *ad libitum*); dieta restritiva (RD, redução de 40% da dieta padrão), dieta controle + probiótico (PB), dieta hipercalórica (HD, dieta com cerca de 30% a mais de Kcal do que a dieta normal, *ad libitum*) e dieta hipercalórica + probiótico (HD+PB, dieta com cerca de 30% a mais de Kcal do que a dieta normal, *ad libitum*) e livre acesso à água. O probiótico será administrado diariamente por gavagem. Já para os experimentos III e IV, machos (n=10/grupo) com 21 dias de idade, após o desmame, também receberão um dos 5 diferentes tipos de dieta e passarão por testes de comportamento ao longo da vida. No material biológico coletado serão determinados os níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias, ácidos graxos e fator de crescimento na placenta; os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral. Também será avaliada a permeabilidade da barreira hematoencefálica; o estado de ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo; o nível de infiltração linfocitária no tecido nervoso; a expressão da sirtuína-1, do *tol-like receptor-4* (TLR-4) e NLRP3 no hipocampo e no córtex cerebral; a neuroplasticidade no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral; e, a expressão do POMC e receptor de leptina no hipotálamo. Os dados estudados serão expressos por média ± erro padrão, e analisados quanto à normalidade. Os dados paramétricos serão analisados por ANOVA de um ou duas vias (de acordo com o objetivo) seguida de Post-Hoc e, os não-



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
Rua Sarmento Leite, 245 - Fone: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303 8810
CEP 91060-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

paramétricos serão analisados por Kruskal-Wallis. O nível de significância aceita será de $p < 0,05$.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de intervenções na dieta de machos (restrição calórica, probióticos e dieta hipercalórica), em diferentes fases da vida do animal, através da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos.

Objetivos específicos:

- Determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ácidos graxos e fator de crescimento na placenta das mães;
- Determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral;
- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica;
- Avaliar o estado de ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo;
- Avaliar o nível de infiltração linfocitária no tecido nervoso;
- Analisar a expressão da sirtuina-1, do *tol-like receptor-4* (TLR-4) e NLRP3 no hipocampo e no córtex cerebral;
- Avaliar a neuroplasticidade no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral;
- Analisar a expressão do POMC e receptor de leptina no hipotálamo.

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Relevância e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Materiais e Métodos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C | D | E |

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Rua Sarmiento Leite, 245 - Fones: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303 8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

Data de Início: 01/06/2020 e Data de Término: 31/05/2023

Comentários gerais sobre o projeto:

--

CURRÍCULO LATTES



Nicole Hiller Bondarczuk

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2404589098232662>

ID Lattes: **2404589098232662**

Última atualização do currículo em 07/02/2022.

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2013). Atualmente é Auxiliar de Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Medicina Veterinária (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Nicole Hiller Bondarczuk

Nome em citações bibliográficas

BONDARCZUK, N. H.

Lattes ID

<http://lattes.cnpq.br/2404589098232662>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCIÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Orientador: Márcia Glovenardi. Coorientador: Ana Carolina de Moura.
2020	Especialização em andamento em Defesa Sanitária e Inspeção de Produtos de Origem Animal. (Carga Horária: 380h). Universidade Candido Mendes, UCAM, Brasil. Título: Queijos Artesanais no Brasil: Legislação e Qualidade Sanitária. Orientador: Caren Pavani.
2008 - 2013	Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Título: Identidade e Qualidade dos Queijos de Origem Brasileira. Orientador: Andrea Troller Pinto. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Formação Complementar

2020 - 2020	Medicina de Urgência e Intensiva em pequenos animais. (Carga horária: 29h). Equalis, EQUALIS, Brasil.
2018 - 2018	Extensão universitária em Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Instituto de Estudos Avançados - USP, IEA-USP, Brasil.
2018 - 2018	Curso de Capacitação em Biossegurança. (Carga horária: 20h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2018 - 2018	Manejo de Animais de Experimentação. (Carga horária: 24h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2014 - 2014	Responsável Técnico em Estabelecimento Alimentar. (Carga horária: 8h). Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, CRMV-RS, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional 2012 - 2012	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 20
Outras informações	Monitoria Presencial Acadêmica Departamento de Medicina Veterinária Disciplina: Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados, Ovos e Mel - Conceito A. Professora orientadora: Marla Monks Jantzen e André Troller Pinto
Vínculo institucional 2011 - 2011	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Outras informações	Bolsista de Extensão/PROEXT Prestação de Serviços: Ação Social e Comunitária Atuação da FAVET em ações para populações em vulnerabilidade sócio-econômico-ambiental do Município de Porto Alegre/RS.
Vínculo institucional 2009 - 2010	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Outras informações	Participante em Nutrição de Grandes Animais Prestação de Serviços: Hospitais, Clínicas e Laboratórios Programa de Oportunidades Acadêmicas do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS Coordenada por: Marcelo Meller Alievi Total de: 100h
Vínculo institucional 2009 - 2009	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Outras informações	Participante em Doenças Infecto-Contagiosas de Cães e Gatos Prestação de Serviços: Hospitais, Clínicas e Laboratórios Programa de Oportunidades Acadêmicas do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS Coordenada por: Marcelo Meller Alievi Total de: 100h
Vínculo institucional 2008 - 2008	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Outras informações	Bolsista de Extensão/PROEXT Prestação de Serviços: Hospitais, Clínicas e Laboratórios. Serviço de Bacteriologia Veterinária 2008 Coordenada por: Marcos Jose Pereira Gomes
Vínculo institucional 2008 - 2008	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 10
Outras informações	Nutrição de Pequenos Animais

Agropet Amigos, AGROPET, Brasil.

Vínculo institucional 2010 - 2010	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 5
Outras informações	Acompanhamento em Clínica de Pequenos Animais

Kunzler, KUNZLER, Brasil.

Vínculo institucional 2013 - 2013	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40,
Outras informações	Regime: Dedicção exclusiva. Estágio curricular em Inspeção Alimentar, Boas Práticas de Fabricação, Microbiologia de Alimentos e Saúde Pública. Indústria de queijos.

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.

Vínculo institucional 2013 - 2013	Vínculo: Não remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40,
Outras informações	Regime: Dedicção exclusiva. Estágio curricular em Microbiologia de Alimentos e Água.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil.

Vínculo institucional 2018 - Atual	Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Veterinária e Zootecnia, Carga horária: 40
--	--

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Agrárias / Área: Medicina Veterinária.
----	--

Idiomas

Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Francês	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. II SIMPÓSIO DE QUEIJOS ARTESANAIS DO BRASIL. Identidade e Qualidade dos Queijos de Origem Brasileira. 2013. (Simpósio).
2. 12º Salão de Extensão UFRGS. Mostra Virtual de Extensão 2011. 2011. (Seminário).
3. Expolinter: Leiteca na Expolinter 2011. 2011. (Feira).
4. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. 2011. (Congresso).
5. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. Análise de Rotulagem de Salsichas Comercializadas no Município de Porto Alegre. 2011. (Congresso).
6. Expolinter: Leiteca na Expolinter 2010. 2010. (Feira).
7. IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2010. (Congresso).
8. Expolinter: Leiteca na Expolinter 2009. 2009. (Feira).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lettes em 13/02/2022 às 18:40:51

[Imprimir currículo](#)