

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

RAISSA GEORGIANNA SILVA CAVALCANTE

**ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactobacillus fermentum* 296 REDUZ A
PRESSÃO ARTERIAL VIA INIBIÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E
MELHORA OS PARÂMETROS METABÓLICOS EM RATOS
DISLIPIDÊMICOS**

JOÃO PESSOA - PB
2019

RAISSA GEORGIANNA SILVA CAVALCANTE

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactobacillus fermentum* 296 REDUZ A PRESSÃO ARTERIAL VIA INIBIÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E MELHORA OS PARÂMETROS METABÓLICOS EM RATOS DISLIPIDÊMICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de pesquisa: Clínica e Epidemiologia Aplicada à Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves.

**JOÃO PESSOA - PB
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376a Cavalcante, Raissa Georgianna Silva.

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactobacillus fermentum* 296 REDUZ
A PRESSÃO ARTERIAL VIA INIBIÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E
MELHORA OS PARÂMETROS METABÓLICOS EM RATOS
DISLIPIDÊMICOS / Raissa Georgianna Silva Cavalcante. -
João Pessoa, 2019.
92 f.

Orientação: José Luiz de Brito Alves.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Dislipidemia. 2. Hipertensão. 3. *Lactobacillus*. 4.
Microbiota. 5. Probióticos. I. Alves, José Luiz de
Brito. II. Título.

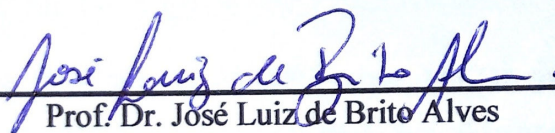
UFPB/BC

RAISSA GEORGIANNA SILVA CAVALCANTE

**ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactobacillus fermentum* 296 REDUZ A PRESSÃO
ARTERIAL VIA INIBIÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E MELHORA OS
PARÂMETROS METABÓLICOS EM RATOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação Aprovada em 23 / 03 /2019.

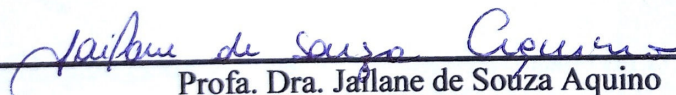
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Orientador titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)



Profa. Dra. Jaílane de Souza Aquino

Membro interno – Titular

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof. Dr. Vinicius José Baccin

Membro interno – Suplente

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Membro externo – Titular

(CAV-UFPE/Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica)

Profa. Dra. Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo

Membro externo – Suplente

(UFCG/ Centro de Educação e Saúde/ Unidade Acadêmica de Saúde)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me dá forças em todos os momentos da minha vida sem nunca me deixar desistir nas atribulações. Por ter me dado serenidade e sapiência nos estudos, e pelo presente da aprovação no mestrado sendo esta uma oportunidade de crescimento pessoal e intelectual que serei eternamente grata ao Senhor.

Ao meu esposo, Rafael de Medeiros Macedo, pela sua dedicação, apoio e compreensão. Por estar comigo em todos os momentos me incentivando e me dando forças para vencer cada obstáculo. Agradeço por ser essa pessoa maravilhosa que me passa felicidade e coragem para sempre procurar as melhores soluções em meio ao caos. Você é luz na minha vida, não sei o que seria de mim sem você! Sem seu companheirismo e amor eu não teria conseguido chegar até aqui. Amo você!

À minha mãe, apesar da distância que nos separa, por ter sido a primeira pessoa a me incentivar a fazer um mestrado. E por todos os anos de dedicação e apoio durante minha infância e adolescência, os quais serviram de embasamento para esta conquista.

Ao meu pai, meu porto seguro, o qual sei que posso contar eternamente, pela ajuda em todos os sentidos durante estes dois anos de mestrado, sem seu apoio eu jamais teria conseguido. Minha eterna gratidão por tudo.

Ao meu irmão, João Vitor, por seu jeito doce e carinhoso despertando o que há de melhor em mim. Amo você!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, por todo aprendizado, atenção e incentivo. Minha eterna admiração pelo senhor como pessoa e profissional que exerce com maestria o dom de ensinar e orientar. O senhor sempre será meu maior exemplo de competência, inteligência e simplicidade na vida acadêmica.

Aos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Nutrição e Hipertensão Arterial Sistêmica (LaNuHas), por toda colaboração e companheirismo durante os experimentos, em

especial, Yohanna de Oliveira, por todo apoio e amizade, Micaelle Oliveira, Georgianna Araújo, Lucas Alves e Emmanuel Veríssimo.

Aos professores responsáveis, técnicos e alunos do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) pela receptividade e contribuição nos experimentos do mestrado.

Aos professores, técnicos e alunos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição, pela parceria e contribuição no nosso projeto, em especial a Thatyane Albuquerque por todos ensinamentos e técnicas repassadas.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dra. Jailane de Souza Aquino e Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva, Prof. Dr. Vinicius José Baccin e Prof^a. Dra. Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo pelo gentil aceite para participação nesta banca e pelas excelentes sugestões que ajudaram na lapidação deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição e aos professores que o integram, por contribuírem com o meu crescimento pessoal e intelectual.

A minha turma de mestrado em Ciências da Nutrição pelas trocas de conhecimentos em sala de aula e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a pesquisa através da concessão de bolsa de estudos.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

As dislipidemias são doenças crônicas, caracterizadas por elevação nos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), associada com diminuição nos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL). Em parte, as alterações no metabolismo dos lipídios estão associadas ao tipo de ácidos graxos ingeridos na dieta. O consumo elevado de ácidos graxos saturados e trans contribui para o aumento dos níveis plasmáticos de LDL, CT, TG e redução de HDL. Adicionalmente, as dislipidemias podem favorecer o desenvolvimento de resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doenças cardiovasculares. Estudos apontam que os probióticos, se consumidos em quantidades adequadas, podem desempenhar um papel importante na melhoria de distúrbios no metabolismo lipídico, na redução de marcadores inflamatórios, na atenuação do estresse oxidativo e na redução da pressão arterial. Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação com a cepa de *Lactobacillus fermentum* 296 em ratos dislipidêmicos sobre os parâmetros cardiometabólicos. Trata-se de um ensaio não clínico realizado com ratos Wistar machos com ± 90 dias de idade que foram divididos em três grupos: grupo controle (CTL), dislipidêmico (DLP) que recebeu dieta dislipidêmica e solução placebo (PBS), e o grupo dislipidêmico tratado com *L. fermentum* 296 (DLP + Lf296) com dieta dislipidêmica e suplementação por gavagem com *L. fermentum* 296 ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL) diariamente por 4 semanas. No final do estudo, o sangue foi coletado para testes bioquímicos, foram realizados testes de tolerância à glicose oral (TOTG) e insulina (TTI) e, finalmente, os ratos foram submetidos à cirurgia para inserção de cânulas na artéria femoral para posterior aferição da pressão arterial basal, obtenção de registros da frequência cardíaca (FC), análise espectral da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso, sensibilidade barorreflexa, equilíbrio simpático-vagal e tônus vascular simpático em cada grupo. Os ratos foram eutanasiados e os órgãos foram coletados para pesagem. Finalmente, as fezes foram coletadas e a contagem de *Lactobacillus* spp foi realizada. A intervenção com *L. fermentum* 296 foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de colesterol total ($111,5 \pm 10,0$ vs. $161 \pm 18,2$ mg/dL), LDL ($84,9 \pm 10,7$ vs. $142,6 \pm 20,9$ mg/dL) e triglicerídeos ($52,5 \pm 4,6$ vs. $85 \pm 8,3$ mg/dL) ($p < 0,05$) nos ratos dislipidêmicos. A administração de *L. fermentum* 296 preveniu o aumento de pressão arterial sistólica ($149,5 \pm 3,3$ vs. $162,5 \pm 1,6$ mmHg, $p < 0,05$), e do tônus cardiovascular simpático ($-50,8 \pm 3,5$ vs. $-63,4 \pm 3,0$ mmHg, $p < 0,05$) em ratos alimentados com dieta dislipidêmica. A administração de *L. fermentum* 296 não foi capaz de prevenir a resistência à insulina ($p > 0,05$) e o dano no controle baroreflexo cardíaco ($p > 0,05$) causado pela dieta dislipidêmica. Estes resultados indicam que *L. fermentum* 296 apresenta potencial para uso como probiótico com habilidades de modular parâmetros bioquímicos e cardiovasculares de interesse para o tratamento de doenças cardiometabólicas.

Palavras-chave: Dislipidemia. Hipertensão. *Lactobacillus*. Microbiota. Probióticos.

ABSTRACT

Dyslipidemias are chronic diseases, characterized by elevation in plasma levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL), associated with a decrease in plasma levels of high density lipoprotein (HDL). In part, changes in lipid metabolism are associated with the type of fatty acids ingested in the diet. The high intake of saturated and trans fatty acids contributes to the increase of the plasma levels of LDL, CT, TG and reduction of HDL. In addition, dyslipidemias may favor the development of insulin resistance, systemic arterial hypertension (SAH) and cardiovascular diseases. Studies indicate that probiotics, if consumed in adequate quantities, may play a role in the improvement of disorders in lipid metabolism, reduction of inflammatory markers, attenuation of oxidative stress and reduction of blood pressure. Thus, the general objective of this study was to investigate the effects of supplementation with the *Lactobacillus fermentum* 296 strain in dyslipidemic rats on cardiometabolic parameters. This was a non-clinical trial performed with male Wistar rats at 90 days of age and divided into three groups: control group (CTL), dyslipidemic (DLP), who received a dyslipidemic diet and placebo solution (PBS), and the group with *L. fermentum* 296 (DLP + Lf296) with dyslipidemic diet and gavage supplementation with *L. fermentum* 296 (1.0×10^9 CFU / mL) daily for 4 weeks. At the end of the study, blood was collected for biochemical tests, oral glucose tolerance (OGT) and insulin (TTI) tests were performed, and finally the rats were submitted to surgery for insertion of cannulas into the femoral artery for posterior measurement of the basal blood pressure, obtaining heart rate (HR) records, spectral analysis of systolic blood pressure and pulse interval, baroreflex sensitivity, sympathetic-vagal balance and sympathetic vascular tone in each group. The rats were euthanized and the organs were collected for weighing. Finally, the faeces were collected and the *Lactobacillus* spp count was performed. The intervention with *L. fermentum* 296 was able to prevent the increase of total cholesterol levels (111.5 ± 10 vs. 161 ± 18.2 mg / dl), LDL (84.9 ± 10.7 vs. 142.6 ± 20.9 mg / dl), and triglycerides (52.5 ± 4.6 vs. 85 ± 8.3 mg / dl) ($p < 0.05$) in dyslipidemic rats. The administration of *L. fermentum* 296 prevented increased systolic blood pressure (149.5 ± 3.3 vs. 162.5 ± 1.6 mmHg, $p < 0.05$), and sympathetic cardiovascular tone (-50.8 ± 3.5 vs. -63.4 ± 3.0 mmHg, $p < 0.05$) in rats fed a dyslipidemic diet. The administration of *L. fermentum* 296 was not able to prevent insulin resistance ($p > 0.05$) and damage in cardiac baroreflex control ($p > 0.05$) caused by the dyslipidemic diet. These results indicate that *L. fermentum* 296 presents potential for use as a probiotic with the ability to modulate biochemical and cardiovascular parameters of interest for the treatment of cardiometabolic diseases.

Keywords: Dyslipidemia. Hypertension. *Lactobacillus*. Microbiota. Probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1	Relação entre disbiose intestinal e o desenvolvimento da dislipidemia e HAS	28
Figura 2	Esquema do protocolo experimental do estudo	37
Figura 3	Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca	39
Figura 4	Protocolo esquemático realizado para registro da pressão arterial e frequência cardíaca	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFCS	Sobrenadante da cultura isenta de células
CFE	Extratos livres de células
CONCEA	Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal
CT	Colesterol Total
CTL	Grupo Controle
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doenças Cardiovasculares
DLP	Grupo Dislipidêmico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FC	Frequência Cardíaca
GLP-1	Peptídeo tipo glucagon 1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HF	Alta frequência
IA	Índice aterogênico
IL	Interleucina
IP	Intervalo de Pulso
IPeFarM	Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos
LaConCHA	Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
L-NAME	Éster metílico nitro-L-arginina
LF	Baixa frequência
MDA	Malondialdeído
NaCl	Cloreto de sódio
NE	Norepinefrina
NO	Óxido Nítrico
NOS	NO sintase
NTS	Núcleo do Trato Solitário

OMS	Organização Mundial da Saúde
OD	Densidade óptica
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C-reativa
PT	Potência total
PYY	Peptídeo YY
RVLM	Medula Ventrolateral Rostral
SBRS	Sensibilidade espontânea do barorreflexo
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TG	Triglicerídeos
TNFα	Fator de Necrose Tumoral
TOTG	Teste de tolerância oral à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ASPECTOS GERAIS DAS DISLIPIDEMIAS.....	14
2.2 MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	17
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL	21
2.4 DISBIOSE, DISLIPIDEMIAS E HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	24
2.5 PROBIÓTICOS.....	28
2.5.1 Administração de probióticos nas dislipidemias: achados clínicos e não clínicos.....	31
2.5.2 Administração de probióticos na hipertensão arterial: achados clínicos e não clínicos.....	33
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	35
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	35
3.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.3 DIETAS.....	35
3.4 PREPARAÇÃO DA CEPA DE <i>L. fermentum</i> 296.....	36
3.5 DETERMINAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DA CEPA DE <i>L. fermentum</i> 296.....	36
3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ADMINISTRAÇÃO COM <i>L. fermentum</i> 296.....	37
3.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.7.1 Avaliação do peso corporal.....	37
3.7.2 Análises bioquímicas.....	38
3.7.3 Teste de tolerância à glicose e à insulina.....	38
3.7.4 Medição dos parâmetros cardiovasculares de referência.....	38
3.7.5 Avaliação do controle barorreflexo, função autonômica cardíaca e tônus simpático.....	40
3.7.6 Contagem de <i>Lactobacillus</i> nas fezes.....	41
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE.....	56
APÊNDICE A - ARTIGO.....	57
ANEXO.....	91
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	92

1 INTRODUÇÃO

A dislipidemia multifatorial, caracterizada pelos níveis elevados de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) ou diminuição nos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) (PALINSKI et al., 2009) é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão.

O aumento dos níveis de pressão arterial pode ser consequência da hiperativação simpática, uma condição caracterizada por um aumento na intensidade e na frequência das despolarizações elétricas do nervo simpático e também por um aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas, promove constrição dos vasos sanguíneos periféricos, aumento na resistência vascular periférica e, conseqüentemente aumento nos níveis basais da pressão arterial. A pressão arterial é resultado do produto entre a resistência vascular e o débito cardíaco, duas variáveis que são controladas pelo sistema nervoso autônomo (Simpático e Parassimpático) (MALPAS et al., 1998; GUYENET et al., 2006; GRASSI et al., 2015).

Achados recentes têm demonstrado que níveis elevados de lipídios séricos, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo podem contribuir para uma diminuição da sensibilidade do baroreflexo (SINSKI et al., 2009), maior quimiosensibilidade respiratória (DEL RIO et al., 2012; MORGAN et al., 2016), hiperatividade simpática (CHAN, CHAN, 2012; CHOBANYAN-JURGENS, JORDAN, 2015) e conseqüentemente risco elevado para o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica.

Alterações na composição da microbiota e aumento na permeabilidade intestinal, estão associados com uma translocação facilitada de lipídios dietéticos, colesterol, marcadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio para o sangue (CHAVEZ-TALAVERA et al., 2017; ZAMBRANO et al., 2016).

Em adição, uma dieta rica em gordura saturada e transaturada, parece aumentar a população de *Escherichia coli* e de lipopolisacarídeos, favorecendo o desenvolvimento de processos inflamatórios e disfunções intestinais (KIM et al., 2015).

Neste sentido, é razoável inferir que a modulação da microbiota intestinal pode representar uma estratégia terapêutica potencial para o controle de desequilíbrios na microbiota intestinal em condições fisiopatológicas, incluindo dislipidemias, doenças inflamatórias e hipertensão arterial (ROBLES-VERA et al., 2017).

Por outro lado, é desafiador identificar uma maneira segura e eficaz de manipulação da microbiota intestinal. Evidências crescentes têm demonstrado que a modulação da microbiota intestinal por administração oral de probióticos tem sido eficaz no tratamento e ou/prevenção

de distúrbios cardiovasculares (AHREN et al., 2015; GOMEZ-GUZMAN et al., 2015) e metabólicos (PAN et al., 2010; KIM et al., 2017). Os probióticos são microrganismos não patogênicos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, são capazes de atingir o intestino e conferir benefícios à saúde do hospedeiro (OMS, 2001; PARVEZ et al., 2006).

Em parte, os efeitos benéficos dos probióticos podem ser decorrentes de suas propriedades na regulação do metabolismo lipídico e na função imune. Como o efeito do propionato, um ácido graxo de cadeia curta derivado do processo fermentativo bacteriano, na inibição da síntese de colesterol (LIN et al., 1995). Além disso, várias bactérias intestinais, particularmente *Lactobacillus*, possuem atividades de hidrolase de ácidos biliares e, portanto, exibem a capacidade de hidrolisar sais biliares (BEGLEY et al., 2006). Isso pode afetar o ciclo entero-hepático dos ácidos biliares, levando ao aumento da perda fecal de sais biliares e à redução secundária do colesterol sérico decorrente da estimulação da síntese de ácidos biliares no fígado (FAVIER et al., 1995; JONES et al., 2012).

Cepas probióticas podem ativar as células dendríticas que capturam microrganismos prejudiciais ao organismo, e em seguida, apresentam estes microrganismos aos linfócitos T que produzem citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, além de atenuar a produção de IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α) (KIM et al., 2015).

A capacidade dos probióticos para reduzir a pressão arterial tem sido atribuída à liberação de peptídeos bioativos durante a fermentação de produtos alimentares contendo a proteína do leite (caseína), tais como os peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, como também, a capacidade de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (ROBLES-VERA et al., 2017).

Esses achados têm acirrado a identificação de cepas potencialmente probióticas, como a cepa de *Lactobacillus (L.) fermentum* 296 que apresenta funcionalidades fisiológicas de adesão, agregação, coagregação, antagonismo e sobrevivência à exposição a condições gastrointestinais simuladas, além de não apresentar atividades hemolíticas e mucinolíticas (ALBUQUERQUE et al., 2017). Tais características apontam o *L. Fermentum* 296 como uma iminente estirpe probiótica para utilização em ensaios não clínicos.

Neste sentido, nosso objetivo foi investigar os efeitos da administração oral da cepa de *L. fermentum* 296 sobre os parâmetros cardiovasculares e metabólicos em ratos dislipidêmicos. Como objetivos específicos, temos: realizar o acompanhamento do peso dos ratos; analisar os parâmetros bioquímicos e sensibilidade à insulina e à glicose; avaliar os níveis de pressão arterial e da frequência cardíaca, além de examinar o controle barorreflexo e a modulação autonômica nos animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DAS DISLIPIDEMIAS

Nas últimas décadas houve um aumento exponencial na prevalência de obesidade e dislipidemias como consequência da população mundial ter adotado um estilo de vida menos ativo (sedentário) associado à ingestão elevada de ácidos graxos saturados e trans, açúcares e sal, e o consumo reduzido de fibras (WHO, 2015).

As dislipidemias são doenças crônicas, caracterizadas por níveis plasmáticos elevados de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e/ou LDL, os quais podem ser associados com níveis plasmáticos reduzidos de HDL (RUIZ-NUNEZ et al., 2016). Em parte, as alterações no metabolismo dos lipídios estão associadas ao tipo de ácidos graxos da dieta. Por exemplo, o consumo elevado de ácidos graxos saturados e trans, e colesterol dietético, podem contribuir para aumentos nos níveis plasmáticos de LDL, CT, TG e redução de HDL (RUIZ-NUNEZ et al., 2016).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017), as dislipidemias podem ser classificadas em hiperlipidemias (níveis elevados de lipoproteínas) e hipolipidemias (níveis plasmáticos de lipoproteínas baixos). As dislipidemias também podem ser classificadas de acordo com a fração lipídica alterada em: hipercolesterolemia isolada: aumento isolado do LDL-c ($\text{LDL-c} \geq 160 \text{ mg/dL}$); hipertrigliceridemia isolada: aumento isolado dos triglicérides ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum); hiperlipidemia mista: aumento do LDL-c ($\text{LDL-c} \geq 160 \text{ mg/dL}$) e dos TG ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum); HDL-c baixo: redução do HDL-c (homens $< 40 \text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50 \text{ mg/dL}$) isolada ou em associação ao aumento de LDL-c ou de TG (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Ensaio clínicos e epidemiológicos indicam haver uma correlação positiva entre os níveis elevados de colesterol sérico total, refletindo principalmente a fração lipoproteína-colesterol de baixa densidade (LDL-c), com o desenvolvimento precoce de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (DCV) (COSTABILE et al., 2017; SONG et al., 2017).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular por diversos fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a intimidade da parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial, no qual se diferenciam em macrófagos, que, por sua vez, captam as LDL oxidadas. Uma vez ativados, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica por meio da secreção de citocinas, que amplificam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (HANSSON, 2005).

Diversos mecanismos têm sido propostos para a aterogênese e suas complicações, como a oxidação de lipoproteínas (principalmente lipoproteínas de baixa densidade) e a alteração fenotípica do endotélio vascular, produzindo substâncias quimiotáticas de linfócitos, liberando espécies reativas de oxigênio, promovendo vasoconstrição e reduzindo propriedades antitrombóticas. Um evento coronário agudo é a primeira manifestação da doença aterosclerótica em pelo menos metade dos indivíduos que apresentam esta complicação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que aproximadamente 40% de todas as mortes humanas serão relacionadas às DCV no ano de 2020. A forma mais comum de DCV é a doença arterial coronariana (DAC), responsável por 7,25 milhões de mortes por ano e reconhecida como a principal causa de mortalidade no mundo (COSTABILE et al., 2017).

A DAC tem etiologia multifatorial e a sua prevenção passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto dos fatores de risco, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, tabagismo, sedentarismo e dieta. Existem efeitos biológicos e / ou estatisticamente significativos entre vários fatores de risco para DAC, particularmente LDL, HDL e pressão sanguínea, em indivíduos levemente hipercolesterolêmicos. Um dos principais alvos para reduzir o risco cardiovascular é a redução dos níveis de LDC-c. Estas reduções têm

potencial significância clínica, pois uma redução de 1% no colesterol sérico total tem sido associada a uma diminuição do risco de doença arterial em $2 \pm 3\%$ (COSTABILE et al., 2017).

As estatinas são atualmente os agentes medicamentosos mais eficazes para reduzir os níveis de LDL-C. Entretanto, de aproximadamente 20 milhões de pacientes tratados com estatinas, estima-se que 10% a 20% são incapazes de tolerar a intervenção, ou as doses mais altas necessárias para atingir as metas atuais de LDL-C principalmente devido aos efeitos colaterais relacionados aos músculos (COSTABILE et al., 2017), como dor, sensibilidade, rigidez, câimbras, fraqueza e fadiga localizada ou generalizada. Os sintomas musculares são os mais comuns e podem surgir em semanas ou anos após o início do tratamento. Variam desde mialgia, com ou sem elevação da creatinoquinase, até a rabdomiólise, que é o evento muscular adverso mais grave durante a terapia com estatinas, podendo gerar necrose muscular, distúrbios hidroeletrólíticos graves, lesão renal aguda, coagulopatia, choque e morte. Durante o tratamento com estatinas, podem ocorrer também sintomas ou sinais sugerindo hepatotoxicidade (fadiga ou fraqueza, perda de apetite, dor abdominal, urina escura ou aparecimento de icterícia) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

O aumento do reconhecimento das limitações das estatinas levou a um crescente interesse em terapias não medicamentosas para melhorar os perfis de colesterol no sangue, como é o caso da intervenção com probióticos, com modo de ação que têm o potencial para melhorar os resultados em pacientes com doença coronariana com pouco ou nenhum risco de efeitos colaterais (COSTABILE et al., 2017).

A administração com probióticos reduz as alterações maléficas na composição da microbiota relatadas nas condições de dislipidemias, que ocasionaria aumento na permeabilidade intestinal, favorecendo uma maior translocação de lipídios dietéticos, colesterol, marcadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio para o sangue (CHAVEZ-TALAVERA et al., 2017; ZAMBRANO et al., 2016).

A concentração sanguínea de colesterol total está positivamente associada ao aumento da modulação simpática, no sistema cardiovascular a hipercolesterolemia grave provoca um aumento na pressão arterial diastólica (PAD), e aumento no componente de baixa frequência (LF), indicando ativação do componente simpático, indicando que a hipercolesterolemia pode ser importante para o início da hipertensão (EVANGELHO et al., 2011).

2.2 MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A literatura tem reportado um aumento exponencial da prevalência de hipertensão arterial, afetando quase 1 bilhão de pessoas no mundo. Associado a hipertensão arterial, distúrbios metabólicos, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo II e dislipidemias são reconhecidos como os principais fatores de risco para desenvolvimento de DCV, considerada como a principal causa de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte prematura em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (HEDNER et al., 2012; MILLS et al., 2016).

De acordo com a American Heart Association (2018) a hipertensão fase 1 é caracterizada por pressão arterial entre 130-139 ou 80-89 mmHg e a hipertensão fase 2 por níveis pressóricos ≥ 140 ou ≥ 90 mmHg.

Apesar dos avanços relevantes no entendimento da patogenia da hipertensão arterial, é consenso que inúmeras lacunas acerca dos mecanismos subjacentes a tal condição clínica carecem de elucidação. A regulação da pressão arterial (PA) é uma das funções fisiológicas mais complexas e depende das ações integradas de sistemas cardiovascular, renal, respiratório, neuronal e endócrino (CARTHY, 2014; CARMICHAEL, WAINFORD, 2015).

A PA é resultado do produto entre a resistência vascular e o débito cardíaco, duas variáveis que são controladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA). Por sua vez, o débito cardíaco depende de três variáveis: volume diastólico final; contratilidade do miocárdio; e frequência cardíaca. O volume diastólico final é o volume atingido pela câmara ventricular antes da contração e é determinada pela pressão venosa, que está relacionada ao volume sanguíneo e ao tônus venoso do músculo liso, ambos sobre controle do sistema nervoso simpático. A contratilidade miocárdica e a frequência cardíaca são reguladas por ambas as divisões simpática e parassimpática do SNA (GUYENET et al., 2006).

É bem descrito que a hiperativação simpática, uma condição caracterizada por um aumento na intensidade e na frequência das despolarizações elétricas do nervo simpático e também por um aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas, promove constrição dos vasos sanguíneos periféricos, aumento na resistência vascular periférica e, conseqüentemente aumento nos níveis basais da pressão arterial (MALPAS et al., 1998; GUYENET et al., 2006; GRASSI et al., 2015).

Os neurônios pré-simpáticos da medula rostral ventrolateral (RVLM) foram identificados como uma região chave que gera o estímulo excitatório contínuo aos neurônios

vasomotores pré-ganglionares na medula espinal. Estudos pioneiros durante a segunda metade do século passado demonstraram que a excitação dessa região com microinjeções de l-glutamato aumenta a pressão arterial (DAMPNEY et al., 1981), enquanto a lesão bilateral reduz o fluxo simpático para níveis observados após a transecção espinhal (ROSS et al., 1984). O RVLM contém dois grupos principais de neurônios glutamatérgicos que se projetam para os neurônios pré-ganglionares vasomotores: 1) um expressando todas as enzimas necessárias para sintetizar epinefrina, que é identificada como o grupo de células C1; e 2) os outros neurônios não catecolaminérgicos (STORNETTA et al., 2002).

Os neurônios pré-simpáticos podem ser modulados por aferências dos quimiorreceptores periféricos, barorreceptores e receptores cardiopulmonares, gerando respostas eferentes essenciais para o controle da pressão arterial. Alterações nos mecanismos de controle em curto prazo, tais como prejuízos no controle barorreflexo (MALPAS et al., 1997) ou maior sensibilidade de quimiorreceptores periféricos (MCBRYDE et al., 2013), são descritos como relevantes no desenvolvimento de hiperativação simpática e hipertensão arterial (MARTINKA et al., 2005; KANBAR et al., 2007; GRASSI et al., 2015).

Os barorreceptores arteriais, incluindo os barorreceptores carotídeos e aórticos, são aferentes do arco barorreflexo. Os corpos celulares desses barorreceptores estão localizados nos gânglios nodosos e petrosos e suas terminações inervam vasos sanguíneos arteriais do seio carotídeo e arco aórtico. Esses terminais detectam alterações da vascularização arterial no seio carotídeo e arco aórtico e produzem sinais elétricos excitatórios, que são integrados e modulados nos barorreceptores arteriais. Em seguida, o sinal integrado é transmitido para a região dorsal medial do núcleo do trato solitário (um componente central do arco barorreflexo) na medula dorsal. Finalmente, esta excitação evoca respostas periféricas simpático-inibitórias e parassimpático-excitatórias. Portanto, a consequência da ativação dos barorreceptores arteriais é diminuir a frequência cardíaca, o débito cardíaco e a resistência vascular periférica e neutralizar reflexivamente um aumento na pressão arterial e da frequência cardíaca (BENARROCH, 2008).

Os barorreceptores dos seios da aorta e carótida funcionam como uma entrada para o barorreflexo arterial, fornecendo sinais aferentes para a região dorsomedial do núcleo do trato solitário e, posteriormente, auxiliando na manutenção da pressão arterial em níveis normais através de um circuito de feedback negativo. Quando a pressão arterial aumenta, a excitação desencadeada por distensão vascular desses barorreceptores arteriais resulta em redução do fluxo simpático periférico e ativação do fluxo parassimpático periférico, e reflexivamente restaura a pressão arterial para níveis normais. Por outro lado, quando a pressão arterial diminui,

a excitação dos barorreceptores arteriais leva à hiperativação simpática periférica e ao silenciamento da atividade parassimpática periférica. Essas alterações contribuem para normalização da pressão arterial (THRASHER, 2002).

Quando uma mudança mecânica na vasculatura arterial precisa ser traduzido em um sinal excitatório e, em seguida, transmitido para a região dorso-medial do núcleo do trato solitário, é necessário que três processos funcionais sucessivos ocorram. A distensão vascular e a deformação de terminais dos barorreceptores arteriais são o primeiro passo. Na adventícia e na parte média do arco aórtico e seio carotídeo, terminais nervosos sensoriais dos barorreceptores aórticos e carotídeos estão embutidos de componentes como elastina, colágeno e células musculares na parede vascular. Essa estrutura específica garante um acoplamento viscoelástico entre os componentes da parede vascular arterial e os terminais de barorreceptores arteriais. Deformações nos terminais dos barorreceptores são disparados pela distensão mecânica da vasculatura arterial quando a pressão arterial aumenta. A transdução mecanoelétrica é o segundo passo. Canais iônicos mecanossensíveis são ativados pela deformação dos terminais barorreceptores, induzindo sua despolarização. Isto completa a conversão de mecânica para energia elétrica nesses terminais. A tradução de despolarização da membrana em potenciais de ação é o terceiro passo. Canais iônicos mecanossensíveis atingem um limiar de tensão (um nível específico de voltagem para cada célula excitável) e canais iônicos dependentes de voltagem (incluindo canais de Na^+ , Ca^{2+} , e K^+) são ativados sucessivamente para gerar potenciais de ação. Finalmente, os potenciais de ação gerados nos terminais são transportados ao longo da periferia e centralmente para a região dorsal medial do núcleo do trato solitário (BROWN, 1980; CHAPLEAU et al., 2007).

O sistema nervoso autônomo cardíaco, constituído pelos componentes simpático adrenérgico e parassimpático colinérgico, tem mostrado papel relevante em muitas doenças cardiovasculares, como insuficiência cardíaca, hipertensão, fibrilação atrial e arritmias ventriculares (MANCIA, GRASSI, 2014; FLOREA, COHN, 2014). Particularmente, um aumento da atividade nervosa simpática e a redução do tônus cardíaco vagal são relatados na maioria dessas condições. A função autonômica pode ser mensurada de forma não invasiva através de sinais fisiológicos de frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC), ou a flutuação no período de tempo entre os batimentos cardíacos (intervalos R-R), fornece uma medida simpática e interação parassimpática e, portanto, pode ser utilizada na avaliação do sistema nervoso autonômico cardiovascular. No domínio da frequência, os componentes de alta frequência (High frequency, HF) reflete a função parassimpática e é influenciada pela frequência respiratória, enquanto a

variabilidade da baixa frequência (Low frequency, LF), é devida a uma combinação de estímulos simpáticos e parassimpáticos e alterações induzidas pelo barorreflexo cardíaco (MULKEY et al., 2018). Neste sentido, a VFC pode ser usada como um marcador para função autonômica em diversas condições fisiopatológicas. Estudos experimentais demonstraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) exibiram um aumento na banda LF do AP e uma relação LF / HF elevada, que poderiam contribuir para a hiperatividade simpática e o desenvolvimento de hipertensão (ZAMO et al., 2010).

Os rins também desempenham um papel importante no controle da pressão arterial, regulando a excreção de sódio e aumentando ou diminuindo o volume sanguíneo (MENNUNI et al., 2014). Essa regulação é conduzida por meio de um mecanismo hormonal, chamado sistema renina-angiotensina-aldosterona (NEVES et al., 2018). Alterações em nível de sistema renal, tais como: diminuição na taxa de filtração glomerular e/ou hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial (MENNUNI et al., 2014). Em adição é bem reconhecido que o endotélio desempenha funções homeostáticas essenciais na manutenção dos níveis adequados da pressão arterial, a citar: regulação do tônus vascular, circulação de células do sangue, inflamação e atividade plaquetária. Estudos realizados revelam que a hipertensão arterial e cardiopatias estão associadas com alterações relacionadas ao vasorrelaxamento dependente do endotélio, denominada de disfunção endotelial (THAKALI et al., 2006; VANHOUTTE, 2009; TOUSOULIS et al., 2014;).

Estudos prévios têm demonstrado que um desequilíbrio oxidativo entre os fatores pró-oxidantes e enzimas antioxidantes associado com níveis elevados de marcadores pró-inflamatórios, podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial (CHAN, CHAN, 2012; BRITO ALVES et al., 2016).

Mecanicamente tem sido descrito que níveis elevados de marcadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio podem contribuir para diminuição da sensibilidade do barorreflexo (SINSKI et al., 2009), maior quimiosensibilidade respiratória (DEL RIO et al., 2012; MORGAN et al., 2016) e hiperatividade simpática (CHAN, CHAN, 2012; CHOBANYAN-JURGENS, JORDAN, 2015).

Recentemente, tem sido proposto que a microbiota intestinal pode influenciar a resposta inflamatória do hospedeiro e exercer uma função relevante no desenvolvimento de hipertensão tanto em seres humanos como em modelos animais (GKOLFAKIS, DIMITRIADIS, TRIANTAFYLLOU, 2015).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL

O conceito do microbioma humano foi sugerido pela primeira vez pelo Dr. Joshua Lederberg, laureado com o Nobel, que cunhou o termo “microbioma” para descrever a comunidade de genomas ecológicos de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que vivem em associação com o corpo humano (LEDERBERG, 2006).

O microbioma humano contém aproximadamente 9 milhões de genes. Isso reflete 450 vezes mais o número de genes no genoma humano. A microbiota humana compreende trilhões de microrganismos, abrangendo pelo menos 1.000 espécies prevalentes que habitam o corpo humano em um ecossistema complexo e altamente dinâmico. A maioria dos microrganismos no corpo de um indivíduo saudável são bactérias. A microbiota humana contém aproximadamente $3,8 \times 10^{13}$ células bacterianas, que habitam principalmente o cólon de maneira simbiótica (LI et al., 2014).

Uma microbiota intestinal saudável é composta principalmente de bactérias pertencentes aos filos Firmicutes (Gram +) e Bacteroidetes (Gram-), sendo Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomimicrobia a segunda linha de colonização (XU, WANG, ZHANG, 2015). O Firmicutes inclui um grande número de gêneros com membros proeminentes no intestino humano sendo Eubacterium, Roseburia, Ruminococcus e, em menor extensão, Lactobacillus. Os Bacteroidetes incluem bactérias pertencentes principalmente aos gêneros Bacteroides e Prevotella (LE CHATELIER et al., 2013). Embora a distribuição desses filos varie entre as populações, é possível definir um pequeno número de padrões para a composição da microbiota intestinal, denominados enterotipos, que não dependem do país ou o continente dos sujeitos. Além da população de bactérias, várias espécies de archaea, protozoa, fungos e vírus também compõem a microbiota humana (ARUMUGAM et al., 2011).

A composição microbiana é descrita em riqueza e uniformidade. No nível das espécies, a riqueza ("quem está presente") descreve o número de espécies presentes no intestino, enquanto a uniformidade ("quantas estão presentes") representa a abundância relativa de cada espécie. Os microorganismos são geralmente membros residentes do ecossistema, mas alguns podem ser transientemente introduzidos do ambiente, por exemplo, pela ingestão de alimentos, ou descartados pelo uso de terapias antibióticas. É importante ter em mente que o trato gastrointestinal é um ambiente desafiador para se estudar, especialmente em humanos, e que a maioria dos dados disponíveis até o momento sobre microbiota humana parte de análises fecais, que, portanto, não representam o quadro real do intestino completo. De fato, cada região

anatômica distinta do trato gastrointestinal possui suas próprias condições físico-químicas (suprimento de nutrientes, enzimas digestivas, pH, potencial redox, ácidos biliares ou muco) que afetam a microbiota intestinal (ZOETENDAL et al., 2008).

A microbiota intestinal requer nutrientes e energia para crescer e manter os processos celulares. As fontes de substratos incluem componentes alimentares dietéticos ingeridos e componentes derivados do hospedeiro, tais como células epiteliais e muco. Ao usar esses substratos, as bactérias produzem uma série de moléculas que influenciam a saúde e o metabolismo humano. A microbiota intestinal também sintetiza várias moléculas e vitaminas, como a vitamina K e constituintes da vitamina B, que contribuem diretamente para a nutrição humana por meio de sua absorção intestinal (EBLANK et al., 2013).

A fermentação de carboidratos é uma importante função metabólica da microbiota intestinal humana, particularmente no cólon. Uma grande parte (cerca de 15%) dos carboidratos alimentares ingeridos, como os amidos resistentes ou as pectinas, não são digeríveis. Estes hidratos de carbono não digeríveis podem atingir o cólon onde são fermentados por bactérias do cólon (por exemplo, bifidobactérias) e convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases (CO_2 , H_2 e metano), que também são utilizados como carbono e fontes de energia por outras bactérias mais especializadas (IRD et al., 2000).

Os principais AGCC produzidos por fermentação são acetato, propionato e butirato. Eles têm vários efeitos biológicos no trato intestinal, incluindo aumento na taxa de proliferação de células epiteliais, diferenciação de células epiteliais, integridade das proteínas de junção no cólon, além de regular as funções imunológicas. Os AGCC também podem ativar receptores específicos acoplados à proteína G (Gpr41 e Gpr43) em células epiteliais do cólon e células enteroendócrinas, resultando na liberação do peptídeo YY (PYY) e do peptídeo tipo glucagon 1 (GLP1), que são importantes hormônios intestinais na fisiologia humana (VERARD, CANI, 2014). Essas ações podem contribuir para reduzir a ingestão alimentar e proteger contra a hipertensão (YU et al., 2003). O butirato é uma fonte de energia para as células epiteliais do cólon, enquanto o acetato e propionato são absorvidos e metabolizados em outros tecidos, principalmente no fígado, onde são substratos da gliconeogênese e regulam a lipogênese. Além desses importantes efeitos biológicos, os AGCC contribuem coletivamente para as necessidades energéticas diárias humanas (estimadas em cerca de 10%) recuperando a energia “perdida” do intestino delgado (YU et al., 2003).

A fermentação de proteínas pela microbiota leva à produção de aminoácidos de cadeia ramificada e uma variedade de metabólitos fenólicos e outros metabólitos que podem ser tóxicos para o hospedeiro (WINDEY et al., 2012). Esses compostos são normalmente

desintoxicados na barreira intestinal e pelo fígado, mas podem ter efeitos prejudiciais em algumas condições patológicas. Por exemplo, durante doenças renais crônicas, as toxinas urêmicas derivadas do intestino, a citar o p-cresol, contribuem para a resistência à insulina e complicações metabólicas. Além disso, compostos como amônia, certas aminas e sulfeto de hidrogênio, podem ser envolvidos no aumento da permeabilidade intestinal, processos de inflamação e danos no DNA (KOPPE et al., 2013).

O papel da microbiota intestinal na regulação do metabolismo lipídico do hospedeiro, particularmente o colesterol, também tem sido proposto. Um dos mecanismos baseia-se no efeito do propionato derivado da fermentação sobre a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase no fígado, levando a uma inibição da síntese de colesterol (LIN et al., 1995). Além disso, várias bactérias intestinais, particularmente lactobacilos, possuem atividades de hidrolase de ácidos biliares (BEGLEY et al., 2006). A atividade da hidrolase de ácidos biliares afeta o ciclo entero-hepático dos ácidos biliares, levando ao aumento da perda de sais biliares e redução secundária do colesterol sérico devido à estimulação da síntese de ácidos biliares no fígado. Outras modificações dos ácidos biliares pela microbiota intestinal levam à produção de ácidos biliares secundários que podem ativar receptores no trato intestinal e outros tecidos (por exemplo, FXR, PXR e TGR5), resultando em importantes efeitos regulatórios no metabolismo do corpo inteiro e na inflamação (AGUIAR VALLIM et al., 2013).

A composição da microbiota intestinal depende de muitos fatores, sendo a dieta um dos mais importantes. As escolhas dietéticas de curto e longo prazo demonstram influenciar a microbiota intestinal humana (MASLOWISKI, MACKAY, 2011; DAVID et al., 2014).

Algumas das influências ambientais mais fortes na composição da microbiota intestinal relacionam-se com fatores de estilo de vida ocidentais (XU, KNIGHT, 2015), incluindo dietas ricas em gorduras saturadas e com poucas fibras, emulsificantes em alimentos processados (CHASSAING et al., 2015), edulcorantes artificiais (SUEZ et al., 2014), uso de antibióticos (incluindo aqueles utilizados em alimentos) (SMITH et al., 2002) e o sedentarismo (CLARKE et al., 2014).

Embora os fatores genéticos do organismo hospedeiro possam influenciar a composição da microbiota intestinal (GOODRICH et al., 2014; XIE et al., 2016), um estudo relatou que os mesmos foram estimados em apenas 12% para a composição da microbiota intestinal, enquanto a dieta representou 57% (ZHANG et al., 2010). Portanto, as alterações na dieta podem modificar o perfil da microbiota intestinal alterando a prevalência de certas espécies bacterianas, além de introduzir novas espécies. (MARQUES, MACKAY, KAYE, 2017).

A relação Firmicutes - Bacteroidetes, os dois filos bacterianos mais prevalentes que habitam o intestino, continua a ser usada como medida de estado de saúde ou doença na literatura, cada filo contém centenas de espécies que habitam o intestino e nem todas as espécies dos Firmicutes são susceptíveis de ter um efeito prejudicial sobre a saúde (TURNBAUGH et al., 2006). Estudos reportam que modelos de ratos obesos apresentam contagens mais elevadas de Firmicutes e contagens mais baixas de Bacteroidetes em comparação com modelos normais (TURNBAUGH et al., 2006; LEY et al., 2005).

A literatura tem relatado que a microbiota intestinal de humanos ou camundongos hiperlipidêmicos tem uma proporção significativamente maior de membros do filo Firmicutes - Bacteroidetes (a relação F: B) em comparação com seus controles (PARK et al., 2013; WANG et al., 2015)

A microbiota intestinal é importante para fortalecer a função de barreira do epitélio intestinal, ela também atua como uma primeira linha de defesa contra microorganismos invasores, por competir com os mesmos pelo ambiente e recursos, inibindo assim o crescimento de enteropatógenos invasores por um processo conhecido como resistência à colonização ou exclusão competitiva. Há também evidências de que a microbiota intestinal influencia o sistema imunológico do hospedeiro ao afetar a expressão de imunoglobulinas influenciando a diferenciação de células T (GALLA et al., 2017).

2.4 DISBIOSE, DISLIPIDEMIAS E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Ao longo da última década, foi demonstrado que a composição da microbiota intestinal pode influenciar o binômio saúde-doença da população. A composição da microbiota intestinal é alterada em muitos estados de doença, incluindo doenças cardiovasculares. A patogênese dessas doenças está intimamente influenciada por fatores de estilo de vida, como dieta e exercício (MARQUES, MACKAY, KAYE, 2017).

A alteração geral na composição da microbiota intestinal (por exemplo, alteração, composição anormal e perda de diversidade), como um desequilíbrio nesta composição (quase sempre acarretando em efeitos negativos, como doenças) e/ou mudanças em linhagens específicas dessa composição podem ser denominadas de Disbiose (HOOKS, O'MALLEY, 2017).

Um acúmulo de evidências sugere que a disbiose intestinal induzida por uma dieta rica em gordura saturada e trans promove o desenvolvimento de dislipidemia (Figura 1), obesidade,

hipertensão arterial, resistência à insulina e outras síndromes metabólicas (ECKEL, GRUNDY, ZIMMET, 2005; SEKIROV et al., 2010).

O consumo de uma dieta dislipidêmica durante a gestação e lactação em ratas Wistar causou disbiose intestinal nas progenitoras e na prole de ambos os sexos, aos 30 e 90 dias de idade. Os resultados deste estudo também demonstraram que uma dieta dislipidêmica durante a gravidez e lactação afetou negativamente a função hepática materna, causando alterações no parênquima hepático, acúmulo de triglicerídeos, doença hepática gordurosa não alcoólica e lesão hepática (PINHEIRO et al., 2019).

Tem sido demonstrado que os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) têm uma barreira intestinal com permeabilidade aumentada e marcadores fibróticos e inflamatórios, combinados com proteínas de junção alteradas e diminuição do fluxo sanguíneo (STEWART et al., 2016; SANTISTEBAN et al., 2017). No estudo realizado por Santisteban et al. (2017) foi relatado que os SHRs pré-hipertensivos não mostraram alterações na microbiota intestinal ou na relação Firmicutes - Bacteroidetes em comparação com os ratos controle, o que apoia a hipótese de que o desenvolvimento da disbiose intestinal coincide com o aumento da PA.

No estudo realizado por Guimarães et al. (2017), a prole DLP de ratas Wistar alimentadas com dieta dislipidêmica, aos 90 dias de idade, apresentou maior pressão arterial média e aumento do componente de baixa frequência (LF) e maior razão LF: HF quando comparados com os descendentes do grupo controle.

O papel da disbiose da microbiota intestinal no desenvolvimento da hipertensão humana recebeu atenção crescente nos últimos anos. Uma análise do gene 16S em uma pequena coorte de sete pacientes com hipertensão e dez indivíduos normotensos, mostrou que o microbioma do intestino humano em pacientes com hipertensão apresentava menor diversidade microbiana que o microbioma de um indivíduo saudável (YANG et al., 2015).

Em outro estudo, a microbiota intestinal de ambos os pacientes com pré-hipertensão e os pacientes com hipertensão apresentaram menor riqueza genética e diversidade a partir de controles saudáveis. Dois achados principais foram identificados: a microbiota intestinal em pacientes com pré-hipertensão e em pacientes com hipertensão apresentou maior porcentagem de bactérias do gênero *Prevotella*, enquanto que a microbiota intestinal de controles saudáveis foi composta principalmente de bactérias do gênero *Bacteroidetes* (LI et al., 2017). Em comparação com controles saudáveis, pacientes com pré-hipertensão ou hipertensão apresentam níveis mais baixos de bactérias, como *Faecalibacterium*, *Roseburia* e *Bifidobacterium*, que geralmente são associadas à homeostase intestinal e à produção do butirato (LI et al., 2017).

Através das ações dos AGCCs produzidos pela microbiota intestinal, ela parece ser uma moduladora crucial da resposta imune e inflamatória (MASLOWSKI et al., 2009; MASLOWSKI, MACKAY, 2011; THORBURN, MACIA, MACKAY, 2014). O papel benéfico de AGCCs em doenças inflamatórias pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo efeito direto deles em células imunes, particularmente células T e células inflamatórias, como neutrófilos (THORBURN et al., 2015).

Essas observações são consistentes com descobertas mais recentes de que o acetato e o propionato reduzem os níveis de PA em modelos de ratos hipertensos SHR e em camundongos com infusão de Ang II (PLUZNICK et al., 2013). O propionato aumentou a liberação de renina, a enzima limitante da taxa do sistema renina-angiotensina-aldosterona em uma preparação in vivo de células justa-glomerulares renais isoladas. No entanto, a administração de propionato em camundongos resultou em uma redução aguda, dose-dependente, mas de curta duração de 20 mmHg na PA, indicando que o propionato atua em diferentes mecanismos renais (PLUZNICK et al., 2013). Em um modelo de lesão isquêmica no rim, a administração intraperitoneal do acetato, propionato e butirato reduziu significativamente a inflamação e lesão tecidual e melhorou a função renal (ANDRADE-OLIVEIRA et al., 2015).

O eixo do sistema nervoso simpático - intestino, provavelmente estará envolvido na regulação da PA. No entanto, a relação causal entre os dois sistemas ainda não está clara. A microbiota intestinal e a disbiose são essenciais para o desenvolvimento da hipertensão, e essa disbiose intestinal não é apenas uma consequência do aumento da PA, mas uma causa direta do aumento da PA. (MARQUES, MACKAY, KAYE, 2017).

A modulação da microbiota intestinal com utilização de probióticos tem sido proposta como uma terapia potencial para prevenção e/ou tratamento da hipertensão arterial e dislipidemias (ROBLES-VERA et al., 2017).

No estudo realizado por Song et al. (2017), um tratamento de 4 semanas com *Lactobacillus plantarum* LIP-1 micro encapsulados foi capaz de recuperar parcialmente a disbiose induzida por HFD em ratos. Ao mesmo tempo, LIP-1 modulou de forma benéfica algumas bactérias intestinais associadas ao metabolismo lipídico sérico. Além disso, um maior conteúdo de AGCCs fecal foi detectado no grupo de tratamento micro encapsulado com *Lactobacillus plantarum* LIP-1, o que poderia ser o resultado de um aumento nas cepas produtoras de AGCCs. É provável que a administração de LIP-1 promova o crescimento de cepas produtoras de AGCCs que ajudem a reparar eventuais danos na mucosa intestinal, inibem a síntese e assimilação de lipídios e, portanto, diminuem os lipídios do soro em ratos hiperlipidêmicos (SONG et al., 2017).

O estudo realizado por Wang et al. (2015) comprovou que a administração de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4270 poderia modular a microbiota do hospedeiro, particularmente aumentar a proporção de cepas produtoras de AGCCs no intestino e, portanto, baixar os níveis de lipídios séricos em ratos dislipidêmicos.

Alguns estudos mostraram o envolvimento do AGCCs produzido pela fermentação bacteriana intestinal na regulação de lipídios sanguíneos. Por exemplo, o propionato inibe as células epiteliais intestinais na absorção de lipídios, estimula a mucosa intestinal epitelial na proliferação celular e reparação da mucosa colônica danificada (ZHANG et al., 2010; WENZEL et al., 2016), onde o butirato reduz o nível de colesterol hepático, bem como a atividade da piruvato desidrogenase hepática e, assim, diminui a síntese de ácidos graxos (TRAUTWEIN et al., 1998; STAPPENBECK, HOOPER, GORDON, 2002).

Administração de bactérias ácido lácticas pode modular o metabolismo do ácido biliar no intestino, influenciar as vias metabólicas envolvidas na energia e metabolismo lipídico, levando a alterações na peroxidação lipídica modificando a composição da microbiota intestinal (HU, YUE, 2002; WANG et al., 2014).

Essas observações fornecem uma nova perspectiva sobre diversas doenças humanas e sugerem que a microbiota intestinal e seus metabólitos podem exercer uma função relevante no desenvolvimento ou na prevenção de doenças metabólicas (TILG, KASER, 2011; SCOTT et al., 2015).

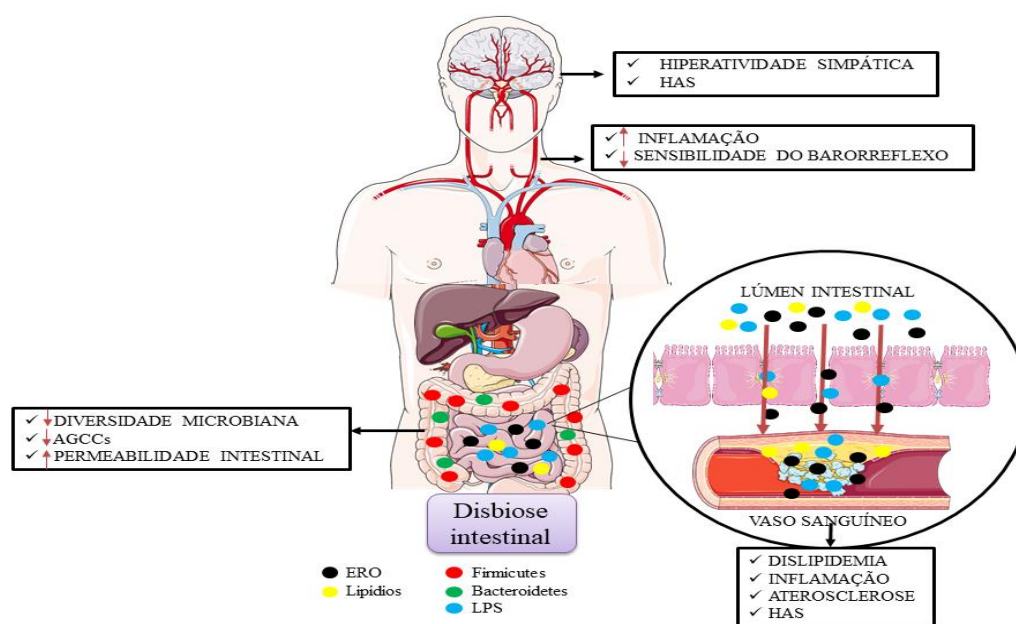


Figura 1. Relação entre disbiose intestinal e o desenvolvimento da dislipidemia e HAS. No quadro de disbiose intestinal há uma redução na diversidade microbiana, assim como uma redução das bactérias produtoras de AGCCs, em conjunto com maior quantidade de bactérias contendo lipopolissacarídeos (LPS) que promove aumento da inflamação local, da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumentando a permeabilidade da barreira epitelial intestinal permitindo que mais LPS bacterianos entrem na circulação sanguínea, assim como ERO e lipídeos dietéticos, que no vaso sanguíneo se acumulam gerando dislipidemia, mais inflamação, podendo ocasionar aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica (HAS), assim como a inflamação sistêmica promove a redução da sensibilidade dos barorreceptores e consequentemente hiperatividade simpática e HAS.

Fonte: autoral.

2.5 PROBIÓTICOS

O termo probiótico ou "para a vida" foi utilizado pela primeira vez para descrever compostos produzidos por protozoários para estimular o crescimento de outros organismos (LILLY, STILLWELL, 1965). Atualmente, o termo "probióticos" refere-se a microrganismos não patogênicos (bactérias ou leveduras) que, quando ingeridos, são capazes de atingir o intestino, em quantidades suficientes para conferir benefícios à saúde (OMS, 2001; PARVEZ et al., 2006).

Os probióticos podem ser ingeridos como suplementos ou incorporados em alimentos ou bebidas disponíveis, como produtos lácteos ou não lácteos (VIJAYA KUMAR et al., 2015). Apesar das diferenças entre as quantidades dos probióticos recomendados por agências americanas ou europeias para apresentar alegações de saúde, números de probióticos em torno de 10^6 - 10^8 log UFC / g-1 (ou mL^{-1}) ou 10^8 - 10^{10} log UFC / dia têm se mostrado ser eficaz (CHAMPAGNE et al., 2011; KECHAGIA et al., 2013).

Com relação à segurança do uso dos probióticos, Thushara et al. (2016) afirmam que os mesmos parecem ter administração segura com muitos benefícios. E em um relatório da OMS (2001), foi incluído que não houve "efeitos negativos agudos" associados ao consumo de probióticos.

Lactobacillus (L.) e *Bifidobacterium genus* (B.) incluem a maioria dos probióticos encontrados no mercado (CHAMPAGNE et al., 2011). Particularmente, as bactérias ácido lácticas *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*, bem como *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum* são citadas entre as principais espécies de probióticos comercializados em todo o mundo. (VIJAYA KUMAR et al., 2015)

Os probióticos mais estudados foram isolados a partir de produtos lácteos e do trato gastrointestinal humano. No entanto, nas últimas décadas cepas potencialmente probióticas a partir de fontes vegetais foram isoladas (RIVERA-ESPINOZA, GALLARDO-NAVARRO, 2010; VITALI et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2017).

Os co-produtos produzidos durante o processamento da fruta preservam muitas das características intrínsecas da fruta, e a variedade de microorganismos isolados à partir deles podem se tornar de interesse potencial para a indústria alimentar, especialmente *Lactobacillus* (GARCIA et al., 2016). Pois, entre as cepas de bactérias lácticas probióticas, o gênero *Lactobacillus* tem sido intensamente estudado para a seleção de espécies probióticas (ARGYRI et al., 2013).

A adaptação natural às características intrínsecas dos frutos, principalmente a acidez e a presença de fenólicos com propriedades antimicrobianas, podem influenciar positivamente a sobrevivência do *Lactobacillus* de origem frutífera durante o processamento e armazenamento de alimentos, como também em exposição às condições ácidas do trato gastrointestinal humano (NEMATOLLAHI et al., 2016; GARCIA et al., 2016).

Lactobacillus fermentum 296 é uma cepa Gram-positiva que foi isolada de coprodutos do processamento do morango e tem uma capacidade de sobreviver ao suco gástrico por

apresentar contagens da cepa após a exposição de 2 h a pH 2 e a exposição de 3 h a pH 3 (ALBUQUERQUE et al., 2017).

A cepa de *L. fermentum* 296 não é capaz de causar hemólise e degradar a mucina (ALBUQUERQUE et al., 2017). A ausência de atividade hemolítica e a capacidade de degradar a mucina são pré-requisitos de segurança recomendados para probióticos, pois as hemolisinas são toxinas que causam a lise dos eritrócitos (ABE et al., 2010).

A incapacidade das cepas de *Lactobacillus* para degradar a mucina é uma característica importante uma vez que a produção de enzimas degradantes de mucina é citada como um fator de virulência em enteropatógenos (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012), pois a presença de mucina cobrindo as células epiteliais intestinais desempenha um papel importante na prevenção da translocação e penetração na mucosa por agentes patogênicos e outros agentes tóxicos (ABE et al., 2010).

Além de não degradar a mucina, a prevenção da adesão de patógenos às células intestinais por probióticos tem sido relacionada à hidrofobicidade da superfície celular (determinada como adesão ao N-hexadecano) (SANTOS et al., 2015). Os valores médios da hidrofobicidade da superfície celular para a cepa de *L. fermentum* 296 revelam hidrofobicidade superficial fraca (ALBUQUERQUE et al., 2017).

A cepa de *L. fermentum* 296 apresenta alta taxa de autoagregação (ALBUQUERQUE et al., 2017) que poderia produzir hipoteticamente os principais efeitos secundários para prevenir a colonização de agentes patogênicos, além de competir melhor pelos locais de ligação do hospedeiro. As altas taxas de agregação facilitam a persistência de organismos benéficos no trato gastrointestinal e a indução de seus efeitos benéficos no hospedeiro (SANTOS et al., 2015).

Durante o processo de seleção de cepas probióticas para aplicações em potencial, vários aspectos precisam ser considerados. Estes incluem segurança para o consumidor (por exemplo, susceptibilidade a antibióticos, atividade hemolítica e degradação de mucina), funcionalidades fisiológicas (por exemplo, tolerância ácida e salina biliar, desconjugação de sal biliar, hidrofobicidade da superfície celular, autoagregação, coagregação com agentes patogênicos e atividade antagonista contra agentes patogênicos). E a capacidade de sobreviver durante a exposição às condições gastrointestinais. Além disso, os aspectos tecnológicos (por exemplo, atividade proteolítica e lipolítica, tolerância ao NaCl, exopolissacarídeo e produção de diacetil) que possam influenciar a estabilidade e a qualidade dos alimentos devem ser considerados (SAARELA, et al., 2000).

A cepa de *L. fermentum* 296 apresenta funcionalidades fisiológicas de adesão, agregação, coagregação, antagonismo e sobrevivência à exposição a condições gastrointestinais simuladas, além de não apresentar atividades hemolíticas e mucinolíticas (ALBUQUERQUE et al., 2017).

Estudos apontam que os probióticos, se consumidos em quantidades adequadas, podem desempenhar um papel importante na melhoria de distúrbios no metabolismo lipídico (AHN et al., 2015; BOUHAFS et al., 2015), na redução de marcadores inflamatórios (TRAINA et al., 2016), na atenuação do estresse oxidativo (BOUHAFS et al., 2015) e na redução da pressão arterial (BRITO ALVES et al., 2016).

2.5.1 Administração de probióticos nas dislipidemias: achados clínicos e não clínicos

Os efeitos benéficos relacionados às cepas probióticas, em parte, se devem às suas propriedades imunomoduladoras e regulação do metabolismo lipídico. Por exemplo, os mecanismos baseiam-se no efeito do propionato, um ácido graxo de cadeia curta derivado do processo fermentativo, na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima sintase hepática, cujo efeito principal é a inibição da síntese de colesterol (LIN et al., 1995). Além disso, várias bactérias intestinais, particularmente *Lactobacillus*, possuem atividades de hidrolase ácida biliar e, portanto, exibem a capacidade de hidrolisar sais biliares (BEGLEY et al., 2006), catalisando a hidrólise da ligação C24-acil-amida do ácido biliar conjugado aumentando a desconjugação do sal biliar intraluminal, resultando em níveis aumentados da circulação de ácidos biliares desconjugados. Uma vez desconjugados, os ácidos biliares são menos solúveis (COSTABILE et al., 2017) o que leva ao aumento da perda fecal de sais biliares e à redução secundária do colesterol sérico resultante da estimulação da síntese do ácido biliar no fígado (FAVIER et al., 1995; JONES et al., 2012).

O *Lactobacillus* também é capaz de promover a assimilação do colesterol e aceleração do metabolismo do colesterol, através da incorporação do colesterol nas membranas celulares ou nas paredes celulares das bactérias, aumentando a resistência das membranas celulares bacterianas à lise, sendo assim, o conteúdo do colesterol do hospedeiro é reduzido (PAN et al., 2010; XIE et al., 2011). O colesterol também pode ser convertido em coprostanol no intestino pelas redutases do colesterol bacteriano e é então excretado diretamente nas fezes, diminuindo a quantidade de colesterol absorvido e resultando em uma redução do nível sérico de colesterol (COSTABILE et al., 2017).

A nível de expressão gênica, a suplementação com *Lactobacillus* pode reduzir o nível de colesterol sérico através da regulação coordenada da biossíntese do colesterol através da regulação negativa de genes relacionadas à síntese e captação de colesterol como SREBP2, que é um importante fator de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos na homeostase do colesterol, como HMGCR, HMGCS e LDLR, este último em conjunto com o SR-B1 controla a expressão de genes envolvidos na absorção de colesterol no plasma e transporte reverso de colesterol mediado por HDL, regulação negativa de genes envolvidos na captação de ácido graxo (CD 36) e síntese de lipoproteínas (ApoB100), outra forma de redução do colesterol sérico é através da regulação positiva dos genes de efluxo de colesterol no fígado, como o gene CYP7A1, responsável pela enzima limitante da síntese clássica de ácidos biliares, como o gene ABCG5, que regula a expressão da bomba de efluxo de colesterol hepático (KIM et al., 2016).

Foi demonstrado que a administração intragástrica de *L. fermentum* SM-7 reduziu os níveis séricos de CT, TG e LDL -C e índice aterogênico (IA) em ratos hiperlipidêmicos (PAN et al., 2010). No estudo realizado por Kim et al. (2017) reduções significativas no CT, TG e LDL-colesterol foram observadas após oito semanas de suplementação com mistura de probióticos contendo dois lactobacilos (*L. reuteri* e *L. plantarum*) e três bifidobactérias (*B. longum*, *B. lactis* e *B. breve*) em ratos hipercolesterolêmicos.

Outro estudo investigou a capacidade de redução dos níveis de colesterol pelo *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 em 49 adultos normais a levemente hipercolesterolêmicos. O grupo que sofreu a intervenção ingeriu 2×10^9 UFC de *L. plantarum* ECGC 13110402 encapsulado duas vezes ao dia. A ingestão diária do tratamento resultou em uma redução nos níveis de LDL-C, CT, TG e um aumento no HDL-C (COSTABILLE et al., 2017).

Ratos hipercolesterolêmicos suplementados com *Lactobacillus fermentum* FTDC 8312 após sete semanas mostraram também uma redução nos níveis séricos de CT, e de LDL-C, aumento nos níveis séricos HDL- C, e diminuição na relação apoB100, porém os níveis séricos de triglicerídeos não apresentaram diferença em relação aos controles (LYE et al., 2017).

Foi demonstrado que o tratamento com *L. fermentum* H9 diminuiu os triglicerídeos totais no fígado de ratos dislipidêmicos em comparação com o grupo não tratado, e ainda foi observada uma redução do acúmulo de lipídeos hepáticos e nos tecidos da aorta nos ratos alimentados com *L. fermentum* H9 (OH et al., 2016).

2.5.2 Administração de probióticos na hipertensão arterial: achados clínicos e não clínicos

A capacidade dos probióticos para reduzir a pressão arterial tem sido atribuída à liberação de peptídeos bioativos durante a fermentação de produtos alimentares contendo a proteína do leite (caseína), tais como os peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, como também, a capacidade de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Porém, outras investigações são necessárias para esclarecer se os efeitos das bactérias probióticas resultam das alterações na microbiota intestinal e seus subprodutos metabólicos; da restauração da função da barreira intestinal; assim como compreender melhor os efeitos na endotoxemia, na inflamação e na atividade do nervo simpático renal (ROBLES-VERA et al., 2017).

Mais recentemente, reportes não-clínicos e clínicos demonstraram de maneira convincente que a melhoria da microbiota intestinal através da administração com probióticos poderia auxiliar positivamente na redução da pressão arterial na condição de hipertensão (ETTINGER et al., 2014; MELL et al., 2015).

Utilizando um modelo de hipertensão, no qual ratos foram tratados com éster metílico nitro-L-arginina (L-NAME), verificou-se que a suplementação com *Lactobacillus plantarum* em mirtilos fermentados (2 g / dia durante 4 semanas, 10^9 UFC) tem significativamente a capacidade de reduzir a pressão arterial sistólica (cerca de 45%) e diastólica (cerca de 45%) em ratos hipertensos (AHREN et al., 2015). Mecanicamente, foi sugerido que a fermentação de mirtilos por *L. plantarum* poderia atenuar a pressão arterial através de mecanismos envolvendo a via dependente de óxido nítrico (NO) (AHREN et al., 2015).

Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a administração a longo prazo de *Lactobacillus fermentum* ou *Lactobacillus coryniformis* + *L. gasseri* ($3,3 \times 10^{10}$ UFC / dia, por cinco semanas) induziu um declínio semelhante e progressivo da pressão arterial sistólica destes ratos sem modificação significativa da frequência cardíaca (FC) (GOMEZ-GUZMAN et al., 2015). Estes resultados foram associados a uma melhoria da disfunção endotelial, atenuação do estresse oxidativo vascular e inflamatório em aorta de ratos (GOMEZ-GUZMAN et al., 2015).

O tratamento com a formulação de probiótico VSL #3 (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*) impediu a disfunção endotelial e melhorou o estresse oxidativo vascular na artéria mesentérica de ratos com hipertensão portal (RASHID et al., 2014).

A administração diária de probiótico *L. paracasei* HII01, xiloligossacarídeo prebiótico ou simbiótico por 12 semanas atenuou a inflamação e a resistência à insulina em ratos Wistar alimentados com uma dieta rica em gordura (EAIMWORAWUTHIKUL et al., 2018).

Em outro estudo, o iogurte probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* La5 e *Bifidobacterium lactis* Bb12 foi administrado em humanos no grupo de intervenção (300 g / d) e iogurte convencional foi administrado ao grupo de controle. No final do período experimental de 6 semanas, o iogurte probiótico aumentou as atividades da superóxido dismutase e glutational peroxidase de eritrócitos no grupo experimental em relação ao grupo controle (EJTAHED et al., 2012).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio não clínico, que foi conduzido em ratos Wistar machos. O mesmo foi realizado no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com ± 90 dias de idade, provenientes do biotério do Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno coletivas (4 animais por caixa), com água filtrada e ração *ad libitum*, em ciclo claro escuro de 12h, com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controladas.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB protocolo 6080240418) (ANEXO A) e seguiram as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os Princípios Internacionais para Pesquisa Biomédica envolvendo Animais.

3.3 DIETAS

A dieta controle (CTL) foi do tipo comercial (Presence Purina®, Paulínea, Brasil). A dieta dislipidêmica (DLP) foi confeccionada pela empresa Rhoster (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). Há diferenças nos percentuais calóricos de proteína (18,3 kcal % DLP vs. 26,8 kcal % CTL) e carboidratos (50,7 kcal % DLP vs. 66,7 kcal % CTL) entre as dietas, no entanto o nível de percentual calórico lipídico está elevado na dieta dislipidêmica (31 kcal % vs. 6,5 kcal % CTL). E as fontes lipídicas são diferentes entre as dietas: a comercial tem 4% de óleo de soja, enquanto a hiperlipídica além de 3% de óleo de soja, tem 6% de gordura animal (banha de porco), 5% de gordura vegetal não-hidrolisada, 0,5% de ácido cólico sigma e 0,5% de colesterol sigma.

3.4 PREPARAÇÃO DA CEPA DE *L. fermentum* 296

A cepa *L. fermentum* 296 foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil). Esta cepa foi previamente identificada usando a análise da sequência do gene 16S rRNA (GARCIA et al., 2016). Os estoques foram armazenados a -20°C no caldo Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; 20 mL/100 mL). As culturas de trabalho foram mantidas aerobicamente em ágar MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) a 4°C .

Cada inóculo foi obtido preparando suspensões em solução tampão fosfato-salino (PBS) estéril de culturas crescidas em caldo MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, Reino Unido) a 37°C . As células foram colhidas por centrifugação ($8000 \times g$, 10 min, 4°C), lavadas duas vezes com solução PBS estéril, ressuspensas em solução PBS e homogeneizadas usando um vortex (30 s) para obter suspensões celulares padrão com densidade óptica (OD) leitura a 660 nm (OD₆₆₀) de 1,0, o que proporcionou contagens viáveis de aproximadamente $9 \log \text{UFC} / \text{mL}$.

3.5 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DA CEPA DE *L. fermentum* 296

A cultura de *L. fermentum* 296 foi centrifugada a $10.000 \times g$ a 4°C durante 20 min para separar o sobrenadante da cultura isenta de células e as células. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em PBS para atingir uma concentração de $1 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ e serviram como células intactas. A capacidade de eliminação de radicais livres de *L. fermentum* 296 foi avaliada utilizando ensaio de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de acordo com Brand-Willians et al. (1995) e Cao et al. (2018).

Um mililitro de células intactas foi misturado com 1 mL de solução de DPPH em metanol (0,2 mM). A mistura foi submetida a vortex durante 30 s e deixada a temperatura ambiente no escuro durante 30 min. A mistura de DPPH e água deionizada serviu como amostra em branco. A absorbância a 517 nm foi registrada. A capacidade de eliminação foi definida da seguinte forma:

$$\text{Efeito de sequestro do radical (\%)} = [1 - A_{517(\text{sample})} / A_{517(\text{blank})}] \times 100\%$$

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ADMINISTRAÇÃO COM *L. fermentum* 296

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (Figura 2): I) grupo controle (CTL, n = 8) que recebeu dieta comercial (Presence Purina®, Paulínea, Brasil); II) grupo dislipidêmico (DLP, n = 8) que recebeu dieta dislipidêmica Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil) e III) grupo dislipidêmico tratado com *L. fermentum* 296 (DLP + Lf296, n = 8). Nos grupos CTL e DLP, a solução PBS foi administrada diariamente como placebo durante 4 semanas. No grupo DLP + Lf296, a estirpe de *L. fermentum* 296 numa solução de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi administrada diariamente durante 4 semanas. A administração de PBS ou *L. fermentum* 296 foi realizada por gavagem uma vez ao dia (no final da manhã).

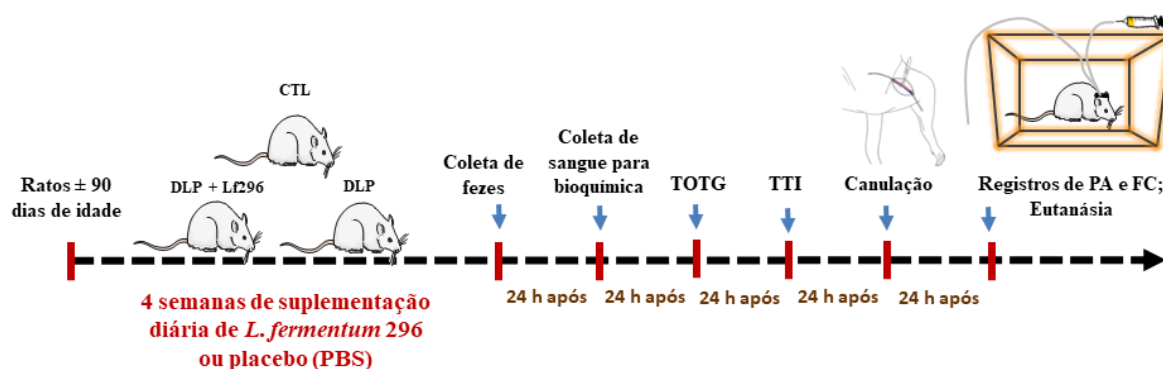


Figura 2. Esquema do protocolo experimental do estudo. CTL: grupo alimentado com dieta controle. DLP: grupo alimentado com dieta dislipidêmica. DLP + Lf296: grupo alimentado com dieta DLP e tratamento com *L. fermentum* 296. TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose. TTI: Teste de Tolerância à Insulina. PA: Pressão Arterial. FC: Frequência Cardíaca.

3.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.7.1 Avaliação do peso corporal e do consumo alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos ratos foram mensurados semanalmente até o final dos experimentos. O peso corporal e o consumo alimentar foram acompanhados utilizando uma balança eletrônica (modelo AS-1000; Marte, Santa Rita MG, Brasil).

3.7.2 Análises bioquímicas

Os ratos passaram por um jejum de 12 h durante o período noturno e amostras de sangue foram coletadas por rompimento do plexo venoso orbital (GUIMARÃES et al., 2017). O sangue foi centrifugado a 5000 $\times g$, 25 °C, por 15 min e mensurações séricas de colesterol total e frações HDL e LDL, e triglicerídeos foram realizadas com kits colorimétricos enzimáticos, conforme instruções do fabricante (Bioclin, Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil). A concentração de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, foi medida como indicativo de estresse oxidativo. Neste ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo de cor vermelha. Em seguida, 400 μ L de ácido perclórico (7%) foram adicionados a 250 μ L de soro, misturados e centrifugados a 6000 $\times g$, 4 °C, durante 20 min. O sobrenadante foi coletado, adicionado a 400 μ L de ácido tiobarbitúrico (0,6%), aquecido a 100 °C durante 1h e lido a 532nm (GUIMARÃES et al., 2017).

3.7.3 Teste de tolerância à glicose e à insulina

Os testes de tolerância oral à glicose (TOTG) e de tolerância à insulina (TTI) foram realizados em ratos em jejum (12 h) durante a noite. No TOTG, uma carga oral de glicose (2g/kg) foi administrada via gavagem. Amostras de sangue foram retiradas das veias da cauda antes e, posteriormente, aos 15, 30, 60, 90 e 120 min da administração de glicose. Após 24 h do TOTG, o TTI foi realizado após injeção intraperitoneal de insulina (0,75 UI/kg de peso corporal) e concentrações de glicose sanguínea medidas antes (0 min) e após 30, 60, 90 e 120 min (GUIMARÃES et al., 2017). Todas as medições da concentração de glicose capilar foram realizadas com um glicosímetro Accu-Check (Bayer®, São Paulo, Brasil).

3.7.4 Medição dos parâmetros cardiovasculares de referência

Pelo menos 48 h após os experimentos de rompimento do plexo retro-orbital, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg / kg, i.p.) e xilazina (10 mg / kg, i.p.) para inserção de cateteres de polietileno na artéria e veia femoral (canulação). Os cateteres foram tunelizados pela região dorsal e cetoprofeno (5 mg / kg) foi injetado por via subcutânea (GUIMARÃES et al., 2017).

Em seguida, os ratos passaram 24 h de recuperação cirúrgica. Após este período, os ratos estavam saudáveis e sem mostrar sinais clínicos de dor ou angústia. Eles foram colocados em uma caixa pletismográfica onde a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram registradas nos animais conscientes conectando a cânula arterial a um transdutor de pressão (ML866 / P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Austrália) (Figura 3) como descrito anteriormente (BRITO ALVES et al., 2014). A PA pulsátil (PAP) e a FC foram registradas por 50-60 min em condições basais, e os valores da PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD), PA média (PAM) e FC foram calculados por uma seleção de 10 min para cada animal (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Utilizando o mesmo período de 10 min dos registros basais de PA e FC, avaliamos a análise espectral no domínio de frequência de SAP e intervalo de pulso (IP) através de um programa de software apropriado (CardioSeries-v.2.4; www.danielpenteado.com).

Os espectros de PAS foram integrados nas bandas LF (0,2-0,75 Hz) e HF (0,75-3 Hz). Além disso, utilizamos a relação LF / HF do IP para avaliar o índice simpato-vagal. Por fim, a sensibilidade espontânea do barorreflexo (SBRs) foi calculada através de um método sequencial (GUIMARÃES et al., 2017).

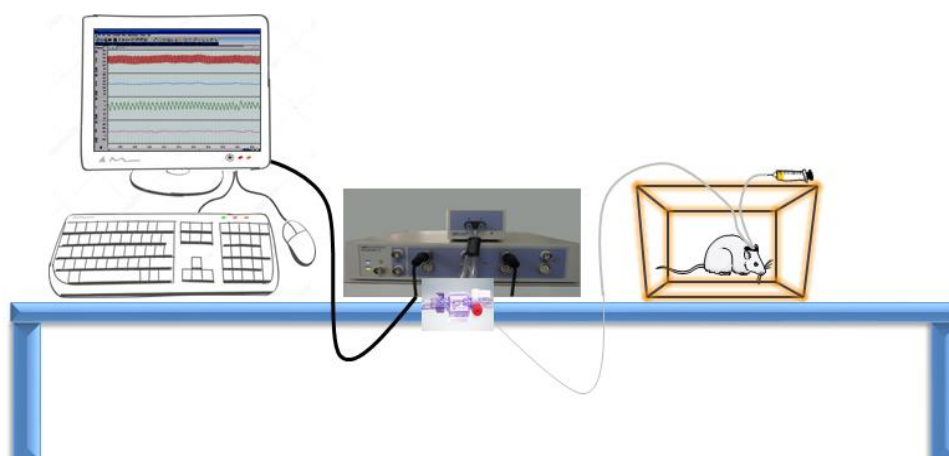


Figura 3. Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca. Após 24 h da cirurgia de canulação, o animal foi colocado em uma caixa pletismográfica, e o cateter inserido na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão conectado ao computador contendo o programa LabChart, no qual podemos visualizar a PA pulsátil, média, sistólica, diastólica e frequência cardíaca. O cateter inserido na veia femoral foi utilizado para administração das drogas posteriormente.

3.7.5 Avaliação do controle barorreflexo, função autonômica cardíaca e tônus simpático

Após 60 min de registros basais de PA e FC (Figura 4), foram utilizadas as respostas cardiovasculares obtidas para drogas vasoativas fenilefrina (8 mg/kg, iv) e nitroprussiato de sódio (25 mg/kg, iv) para avaliar a sensibilidade do barorreceptor, conforme descrito anteriormente (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). As alterações reflexas na frequência cardíaca produzidas pela administração de drogas vasoativas foram quantificadas e plotadas como alterações na frequência cardíaca em relação às mudanças na pressão arterial média ($\Delta FC / \Delta PAM$). Os dados foram analisados por regressão linear usando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) e a inclinação da regressão linear proporcionou ganho barorreflexo para cada animal.

Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares basais, a injeção intravenosa em bolus do antagonista do receptor muscarínico metilatropina (2 mg/kg iv; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e depois de 10 min do antagonista b-adrenérgico cloridrato de propranolol (4 mg/kg, iv. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para avaliar a função autonômica cardíaca (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). O intervalo de tratamento entre as drogas foi de 10 minutos. O tônus parassimpático foi avaliado pela mudança na FC basal causada pela metilatropina, enquanto o tônus simpático foi determinado pela alteração da FC após a administração de propranolol.

Por fim, após 1h da administração de propranolol, a contribuição do tônus vascular simpático para o sistema cardiovascular foi avaliada por injeção intravenosa de bloqueador ganglionar (hexametônio; 30 mg/kg, iv. Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA.). O tônus simpático foi calculado pelas alterações na PAM (ΔPAM) após a administração.

No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma overdose de cetamina (i.v.). Após a eutanásia, os órgãos (coração, fígado e baço) e as gorduras abdominais e viscerais foram coletados para pesagem direta em balança analítica, e sua quantificação foi normalizada pelo peso do respectivo animal.

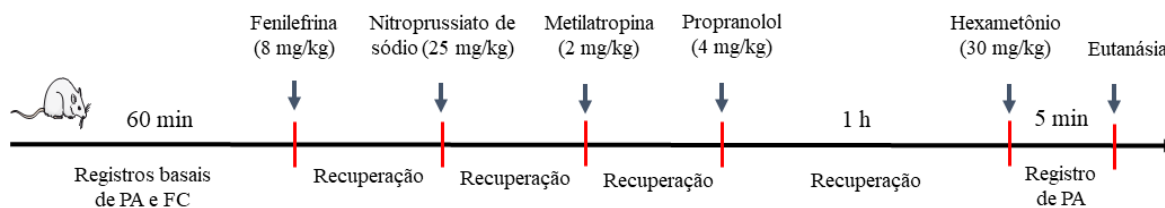


Figura 4. Protocolo esquemático realizado para registro da pressão arterial e frequência cardíaca.
PA: pressão arterial. FC: frequência cardíaca.

3.7.6 Contagem de *Lactobacillus* nas fezes

Ao final das quatro semanas de administração de *L. fermentum* 296 amostras fecais de cada animal foram coletadas para contagem em triplicata do *Lactobacillus* fecal. As amostras fecais foram homogeneizadas em água peptona (100 mg/mL) e diluídas em série no mesmo diluente. Alíquotas de 20 µL das respectivas diluições foram inoculadas usando uma técnica de microdrop (MILES, MISRA, 1938) em Sharpe-MRS (HiMedia, Índia) para contagem de *Lactobacillus* spp. A incubação foi realizada sob condições anaeróbias (anaerogênio do sistema anaeróbio, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) para contagem de *Lactobacillus* spp. Após um período de incubação de 24-48 h, o número de colônias foi contado e os resultados foram expressos como log UFC/g (BATISTA et al, 2018).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O teste de Kolmogorov Smirnov foi usado para avaliar a normalidade dos dados. A maioria das variáveis exigiu teste paramétrico ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. Nos casos em que o teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov falhou, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. ANOVA two-way foi usada em curvas do teste de tolerância à glicose e à insulina. A análise estatística foi realizada utilizando o software computacional Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ABE, F. et al. Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. **Anaer.** v. 16, p. 131–136, 2010.

AGUIAR VALLIM, T.Q. et al. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. **Cell metabolism**, v. 17, n. 5, p. 657-69, 2013.

AHN, H. Y. et al. Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduces fasting triglycerides and enhances apolipoprotein A-V levels in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. **Atherosclerosis.**, v. 241, n. 2, p. 649-656, 2015.

AHREN, I. L. et al. Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. **Clin Nutr**, v. 34, n. 4, p. 719-26, Aug 2015.

ALBUQUERQUE, T. M. R. et al. In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, v.1, p. 1-13, 2017.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. **J. of the am. college of cardiol**, v. 71, n. 19, 2018.

ANDRADE-OLIVEIRA, V. et al. Gut bacteria products prevent AKI induced by ischemia-reperfusion. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 26, p. 1877–1888, 2015.

ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiol**, v. 33, p. 282–291, 2013.

ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**. v. 473, n. 7346, p. 174-80, 2011.

BALAKUMAR, M. et al. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. **Eur J Nutr**, 2016.

BATISTA, K. 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**, v. 119, n. 1, p. 30-41, 2018.

BEGLEY, M., C. et al. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n.3, p. 1729-1738, 2006.

BENARROCH, E. E. The arterial baroreflex: functional organization and involvement in neurologic disease. **Neurol.**, v. 71, p. 1733-1738, 2008.

BOUHAFS, L. et al. Protective effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* BJ0021 on liver and kidney oxidative stress and apoptosis induced by endosulfan in pregnant rats. **Ren Fail**, p. 1-9, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci and Tech.**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRITO ALVES, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, v. 111, n. 4, p. 606-615, 2014.

BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 2016.

BROWN, A. M. Receptors under pressure. An update on baroreceptors. **Circ Res**, v. 46, p. 1-10, 1980.

CAESAR, R. et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, p. 1701–1707, 2012.

CAO, Z. et al. In Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yunnan De'ang Pickled Tea. **Probiotics Antimicrob Proteins**, 2018.

CARMICHAEL, C. Y.; WAINFORD, R. D. Impact of global versus renal-specific sympathoinhibition in aldosterone-induced hypertension: implications for medical device-based treatment of resistant hypertension. **Hypert.**, v. 65, n. 6, p. 1160-2, Jun 2015.

CAROFF, M., KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydr. Res.** v. 338, p. 2431–2447, 2003.

CARTHY, E. R. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. **Ann Med Surg (Lond)**, v. 3, n. 1, p. 2-7, 2014.

CARVALHO-GALVAO, A. et al. Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. **Clin Sci (Lond)**, v. 132, n.14, p. 1513-1527, 2018.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **Int J Food Microbiol**, v. 149, n. 3, p. 185-193, 2011.

CHAN, S. H.; CHAN, J. Y. Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. **J Appl Physiol (1985)**, v. 113, n. 12, p. 1921-1928, 2012.

CHAPLEAU, M. W. et al. Mechanosensitive ion channels in blood pressure-sensing baroreceptor neurons. **Curr Top Membr**, v. 59, p. 541-567, 2007.

CHASSAING, B. et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, p. 92–96, 2015.

CHÁVEZ-TALavera, O. et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterol.**, v. 152, p.1679–1694, 2017.

CHOBANYAN-JURGENS, K; JORDAN, J. Autonomic nervous system activity and inflammation: good ideas, good treatments, or both? **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 12, p. 1999-2001, 2015.

CLARKE, S. F. et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**, v. 63, p. 1913–1920, 2014.

COSTABILE, A. et al. An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. **Plos one**, 2018.

- DAMPNEY, R. A. et al. Brain stem mechanisms in the control of arterial pressure. **Clin Exp Hypertens**, p. 379–391, 1981.
- DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, p. 559–563, 2014.
- DEL RIO, R. et al. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. **Eur Respir J.**, v. 39, n. 6, p. 1492-1500, 2012.
- EAIMWORAWUTHIKUL, S. et al. Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese insulin resistant rats. **Eur J. of Nutr.**, 2018.
- EBLANC, J.G. et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Cur opinion in biotech.** v. 24, n. 2, p. 160-168, 2013.
- ECKEL, R.H., GRUNDY, S.M., ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1415–1428, 2005.
- EJTAHED, H. S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nut**, v. 28, n. 5, p. 539–543, 2012.
- ETTINGER, G. et al. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. **Gut Microbes**, v. 5, n. 6, p. 719-728, 2014.
- FAO / OMS. Organização Mundial da Saúde. Revisão de uma consulta conjunta da FAO / OMS sobre a avaliação da saúde e propriedades nutricionais dos probióticos em alimentos, incluindo leite em pó e bactérias ácido-láticas. Outubro, 2001. Disponível em: ftp.fao.org/esn/food/probio_report_enpdf. Acesso em: agosto de 2017.
- FAVIER, M. L. et al. Fermentable carbohydrates exert a more potent cholesterol-lowering effect than cholestyramine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1258, n. 2, p. 115-121, 1995.
- FLOREA, V. G.; COHN, J. N. The autonomic nervous system and heart failure. **Circ Res**, 2014.
- GALLA, S. et al. Microbiotal-Host Interactions and Hypertension. **Physiol**, v. 32, p. 224–233, 2017.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Front Microbiol**, v. 7, n. 1–11, 2016.

GHAZALPOUR, A. et al. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. **Current opinion in lipidology**, v. 27, n. 2, p. 141-147, 2016.

GKOLFAKIS P, DIMITRIADIS G, TRIANTAFYLLOU K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 14, p. 572–581, 2015.

GOMEZ-SMITH, M. et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiol Behav**, 2016.

GOODRICH, J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. **Cell**, v. 159, p. 789–799, 2014.

GUIMARAES, K. S. L. et al. Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. **Br J Nutr**, v. 118, n. 11, p. 930-941, 2017.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews**. 2006.

GRASSI, G. et al. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 976-990, 2015.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

HEDNER, T. et al. State of global health--hypertension burden and control. **Blood Press**, v. 21, n. 1, p. 1-2, 2012.

HOOKS, K. B.; O'MALLEY, M.A. Dysbiosis and Its Discontents. **mBio**, v. 8, n. 5, 2017.

HU, M., YUE, X. Screening and cholesterol-degrading mechanism of *Lactobacillus plantarum* LP1103. **Food Sci**, v. 6, p. 48–54, 2002.

IRD, A.R. et al. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. **Current issues in intest microbiol**, v. 1, n. 1, p. 25-37, 2000.

JAW, J. E. et al. Lung exposure to lipopolysaccharide causes atherosclerotic plaque destabilisation. **Eur. Respir. J.**, v. 48, p. 205–215, 2016.

JONES, M. L. et al. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. **Eur J Clin Nutr**, v. 66, n. 11, p. 1234–1241, 2012.

KANBAR, R. et al. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. 362–367, 2007.

KECHAGIA, M. et al. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutr**, v. 2013, p. 481–651, 2013.

KIM, S. et al. Hypertensive patients exhibit gut microbial dysbiosis and an increase in TH17 cells. **J Hypertens**, v. 33, Suppl 1, p. 77–78, 2015.

KIM, B. et al. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. **Biochem and Biophysic Research Communicat**, 2016.

KIM, S. et al. Hypocholesterolemic Effects of Probiotic Mixture on Diet-Induced Hypercholesterolemic Rats. **Nutrients**, 2017.

KOPPE, L. et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. **J. of the Americ Society of Nephrology**, v. 24, n.1, p. 88–99, 2013.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541–546, 2013.

LEDERBERG, J. The microbe's contribution to biology--50 years after. **Intern microbiol: the official j of the Spanish Society for Microbiol**, v. 9, n. 3, 2006.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 11070–11075, 2005.

LI, J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature biotechnol**, v. 32, n. 8, p. 834–841, 2014.

LI, J. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 14, n. 5, 2017.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIN, Y. et al. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. **Br J Nutr**, v. 74, n. 2, p. 197-207, 1995.

LINDBERG, A. A., et al. Structure-activity relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. **Rev Infect Dis**, v. 12, p. 133–141, 1990.

LU, Y. C., YEH, W. C., OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, p. 145–151, 2008.

MAITHILIKARPAGASELVI, N. et al. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. **J Complement Integr Med**, v. 13, n. 2, p. 137-143, 2016.

MALPAS, S. C. et al. Baroreflex control of heart rate and cardiac hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension in rabbits. **Hypertension**, v. 29, n. 6, p. 1284-1290, 1997.

MANCIA, G.; GRASSI, G. The autonomic nervous system and hypertension. **Circ Res**, 2014.

MARQUES, F. Z.; MACKAY, C. R.; KAYE, D. M. Beyond gut feelings: how the gut microbiota regulates blood pressure. **Nature Reviews | Cardiology**, p. 1-13, 2017.

MARTINKA, P. et al. Mechanisms of blood pressure variability-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in mice with impaired baroreflex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 3, p. 767-776, 2005.

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nat**, v. 461, p. 1282–1286, 2009.

MASLOWSKI, K. M., MACKAY, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nat. Immunol**, v. 12, p. 5–9, 2011.

MCBRYDE, F. D. et al. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. **Nat Commun**, v. 4, 2013.

MELL, B. et al. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. **Physiol Genomics**, v. 47, n. 6, p. 187-97, 2015.

MENNUNI, S. et al. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. **J Hum Hypertens**, v. 28, n. 2, p. 74-79, 2014.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **J. Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

MILLS, K. T. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. **Circul**, v. 134, n. 6, p. 441-450, 2016.

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **J Funct Foods**, v. 4, p. 531–541, 2012.

MORGAN, B. J. et al. Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 234, p. 47-59, 2016.

MULKEY, S. B. et al. Autonomic nervous system development and its impact on neuropsychiatric outcome. **Ped Research**, v. 85, n. 2, 2018.

NEMATOLLAHI, A. et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electron J Biotechnol**, v. 21, p. 49–53, 2016.

NEVES, M. F. et al. The Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Its New Components in Arterial Stiffness and Vascular Aging. **High Blood Press Cardiovasc Prev**, 2018.

OH, N. S. et al. Short communication: Hypolipidemic and antiinflammatory effects of fermented Maillard reaction products by *Lactobacillus fermentum* H9 in an animal model. **J of Dairy Sci**, 2016.

PALINSKI, W. et al. Influence of maternal dysmetabolic conditions during pregnancy on cardiovascular disease. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 2, n. 3, p. 277-285, 2009.

PAN, D. D. et al. Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **J. Sci Food Agric.**, 2011.

PARK, D.Y., et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. **PLOS ONE**, v.21, n. 8, 2013.

PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **J Appl Microbiol**, v. 100, n. 6, p. 1171-85, 2006.

PINHEIRO, R. O. et al. Maternal dyslipidaemic diet induces sex-specific alterations in intestinal function and lipid metabolism in rat offspring. **Br J Nutr.**, v. 23, p. 1-32, 2019.

PLUZNICK, J. L. et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 110, p. 4410–4415, 2013.

POGGI, M., et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. **Diabetol**, v. 50, p. 1267–1276, 2007.

RASHID, S. K. et al. Probiotics (VSL#3) prevent endothelial dysfunction in rats with portal hypertension: role of the angiotensin system. **PLoS One**, v. 9, n. 5, 2014.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 1-11, Feb 2010.

ROBLES-VERA, I. et al. Antihypertensive Effects of Probiotics. **Curr Hypertens Rep**, 2017.

ROBLES-VERA, I. et al. The probiotic *Lactobacillus fermentum* prevents dysbiosis and vascular oxidative stress in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide blockade. **Molecul Nutr & Food Research**, 2018.

ROSS, C. A. et al. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial

pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **J Neurosci**, p. 474–494, 1984.

ROSSI, G. et al. Comparison of microbiological histological and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL# 3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **PLOS ONE**, v. 9, 2014.

RUIZ-NUNEZ, B. et al. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. **J Nutr Biochem**, v. 36, p. 1-20, 2016.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J Biotechnol**, v. 84, p. 197–215, 2000.

SANTISTEBAN, M. M. et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. **Circ. Res.**, v. 120, p. 312–323, 2017.

SANTOS, K.M.O. et al. Artisanal coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Sci Technol**, v. 95, p. 209–230, 2015.

SCOTT, K. P. et al. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. **Microb Ecol Health Dis**, v. 26, 2015.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, p. 859–904, 2010.

SERRANO, M. et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein as a marker of atherosclerosis. **Atheroscl**, v. 230, p. 223–227, 2013.

SINSKI, M. et al. Atorvastatin reduces sympathetic activity and increases baroreceptor reflex sensitivity in patients with hypercholesterolaemia and systemic arterial hypertension. **Kardiologia Pol**, v. 67, n. 6, p. 613-620, 2009.

SMITH, D. L., et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 6434–6439, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, p. 1-76. 2017.

SONG, J. J., et al. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1 on the gut microbiota of hyperlipidaemic rats, **Brit J of Nutr**, v. 118, p. 481–492, 2017.

STAPPENBECK, T. S., HOOPER, L. V., GORDON, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 15451–15455, 2002.

STEWART, D. C. et al. Hypertension-linked mechanical changes of rat gut. **Acta Biomater.**, v. 45, p. 296–302, 2016.

STORNETTA, R. L. et al. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. **J Comp Neurol**, p. 207–220, 2002.

SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, v. 514, p. 181–186, 2014.

TALEB-BELKADI, O. et al. Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, p. 1-4, 2016.

TAN, J. K. et al. Metabolite-sensing G protein-coupled receptors-facilitators of diet-related immune regulation. **Annu. Rev. Immunol**, v. 35, p. 371–402, 2017.

THAKALI, K. M. et al. Mechanisms of hypertension induced by nitric oxide (NO) deficiency: focus on venous function. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 47, n. 6, p. 742-750, 2006.

THORBURN, A. N. et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. **Nat. Commun.**, v.7320, n. 6, 2015.

THORBURN, A. N., MACIA, L., MACKAY, C. R. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. **Immunity**, v. 40, p. 833–842, 2014.

THUSHARA, R. M. et al. Cardiovascular Benefits of Probiotics: A Review of Experimental and Clinical Studies. **Food & Function**, 2016.

THRASHER, T.N. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, p. 1044–1053, 2002.

TILG, H., KASER, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **J Clin Invest**, v. 121, p. 2126–2132, 2011.

TOUSOULIS, D. et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. **Pharmacol Ther**, v. 144, n. 3, p. 253-267, 2014.

TRAINA, G. et al. Probiotic mixture supplementation in the preventive management of trinitrobenzenesulfonic acid-induced inflammation in a murine model. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 30, n. 3, p. 895-901, 2016.

TRAUTWEIN, E. A. et al. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. **J Nutr.**, v. 128, p. 1937–1943, 1998.

TSUKUMO, D. M., et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1986–1998, 2007.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nat**, v. 444, p. 1027–1031, 2006.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circ J**, v. 73, n. 4, p. 595-601, 2009.

VERARD, A. CANI, P.D. Gut microbiota and GLP-1. **Rev in end & metabolic disord**, v. 15, n. 3, p. 189-196, 2014.

VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V.; REDDY, O. V. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

VITALI, B. et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiol**, v. 31, n. 1, p. 116-25, Aug 2012.

XIE, H. et al. Shotgun metagenomics of 250 adult twins reveals genetic and environmental impacts on the gut microbiome. **Cell Syst.**, v. 3, p. 572–584, 2016.

XU, X.; WANG, Z.; ZHANG, X. The human microbiota associated with overall health. **Crit rev in biotech**, v. 35, n. 1, p. 129-140, 2015.

XU, Z., KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **Br. J. Nutr.**, v. 113, 2015.

WANG, L. et al. Effect of oral consumption of probiotic *Lactobacillus planatarum* P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages. **Nutrit**, v. 30, p. 776–783, 2014.

WANG, J., et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **ISME J**, v. 9, p. 1–15, 2015.

WENZEL, U. et al. Immune mechanisms in arterial hypertension. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 27, p. 677–686, 2016.

WHO, World Health Organization. **Obesity and overweight**, jan 2015. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 10 de setembro de 2017.

WINDEY, K. et al. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecul nutr & food research**, v. 56, n. 1, p. 184-196, 2012.

YANG, T. et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. **Hypert**, v. 65, p. 1331–1340, 2015.

YIDA, Z. et al. High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. **J Biomed Sci**, v. 22, 2015.

YU, M. et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. **J of hypertension**, v. 21, n. 6, p. 1125-1135, 2003.

ZAMBRANO, E. et al. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. **Arch Med Res**, v. 47, n.1, p. 1-12, 2016.

ZAMO, F. S. et al. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats - renin-Angiotensin system modulation. **Clin**, v. 65, p. 85-92, 2010.

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

ZOETENDAL, E.G. et al. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, v. 57, n. 11, p. 1605-1615, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A - ARTIGO

Artigo submetido e em Under Review no Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease (NMCD).

Fator de impacto: 3.31 Qualis Nutrição: A1

The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats

Raissa Georgianna Silva Cavalcante¹, Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque¹, Micaelle Oliveira de Luna Freire¹, Georgianna de Araújo Henriques Ferreira¹, Lucas Alves Carneiro dos Santos¹, Marciane Magnani², Josiane Campos Cruz³, Valdir de Andrade Braga³, Evandro Leite de Souza¹, José Luiz de Brito Alves^{1*}

¹Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. ²Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Brazil ³Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

***Corresponding author:**

José Luiz de Brito Alves, PhD

Federal University of Paraíba, Department of Nutrition

Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil

CEP: 58051-900

Phone/fax: ++ 55 81 9 98455485

jose_luiz_61@hotmail.com

Highlight

- High fat consumption is a risk factor for dysbiosis, dyslipidemias and hypertension.
- Administration of *L. fermentum* 296 recovered fecal Lactobacillus counts and alleviated hyperlipidemia in high fat diet-treated rats.
- Administration of *L. fermentum* 296 reduced sympathetic hyperactivity and systolic blood pressure in DLP in high fat diet-treated rats.
- The strain *L. fermentum* 296 exhibit satisfactory qualities to be translated into new nutritional approaches to prevent or treat the cardiometabolic disease.

ABSTRACT

High fat diet consumption has been associated with gut dysbiosis and increased risk of dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension. Probiotic administration has been suggested as a safe therapeutic strategy for the treatment of cardiometabolic disorders. This study was designed to assess the effects of probiotic *Lactobacillus fermentum* 296, a fruit-derived bacteria strain, against cardiometabolic disorders induced by dyslipidaemic (DLP) diet. Male Wistar rats were divided into control diet (CTL); DLP; and DLP treated with probiotic (DLP+Lf296). The *L. fermentum* 296 strain at 1×10^9 colony forming unit (CFU)/ml was daily administered by oral gavage for 4 weeks. The results showed that dyslipidaemic rats displayed insulin resistance, reduced *Lactobacillus* spp. counts in feces, increased adipose tissue, serum lipids and oxidative profile. Dyslipidaemic rats also demonstrated augmented blood pressure associated to sympathetic hyperactivity and impaired baroreflex control. The administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks recovered fecal *Lactobacillus* sp. counts and alleviated hyperlipidemia, sympathetic hyperactivity and reduced systolic blood pressure in DLP rats without affecting baroreflex sensibility. Our results suggest the ability of *L. fermentum* 296 improve biochemical and cardiovascular parameters altered in cardiometabolic disorders.

Keywords: Dyslipidemia; Hypertension; Microbiota; Probiotics; *Lactobacillus fermentum*.

INTRODUCTION

Increased saturated and trans fat and cholesterol intake the development of dyslipidemia, diabetes mellitus and arterial hypertension [1] and has been considered a relevant risk factor for the development of cardiovascular disease and premature death worldwide [2-4]. High intake of high fat and cholesterol diet contributes to gut dysbiosis [5], chronic low grade inflammation and increased blood reactive oxygen species [6, 7]. These features may lead to impairment of the cardiac baroreflex control [8] and autonomic dysfunction, characterized by increased sympathetic nervous system activity and depressed parasympathetic activity [9, 10].

Growing evidences have suggested that targeting gut microbiota with probiotic intervention may be a safe therapeutic strategy to promote beneficial effects in the treatment and/or prevention of cardiometabolic disorders [11-13]. Probiotic administration has shown effective in improving insulin resistance [14], sympathetic hyperactivity [15], hypertension [16] as well as markers related to dyslipidemias [17]. Probiotics are defined as “non-pathogenic microorganisms that administrated in adequate amounts confer health benefit on the host” [18, 19]. Amongst the commonly probiotics used for therapeutic intervention, the genus *Lactobacillus* include species with well-known effects on the improvement of cardiometabolic disorders [11, 13, 15, 20].

Recently, different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products were identified using 16S rRNA gene sequence analysis [21] and characterized for a set of standard probiotic-related attributes *in vitro* [21-23]. Among these strains, *L. fermentum* 296 showed satisfactory performance in a series of safety and physiological functionality tests, such as adhesion, auto aggregation, coaggregation, antagonism against pathogens besides the lack of hemolytic and mucinolytic activity. Additionally, this strain showed good survival when challenged with simulated gastrointestinal conditions in distinct food matrices [22]. However, the effects of *L. fermentum* 296 on improving lipid-glucose profiles and cardiovascular parameters in dyslipidemic conditions remain unknown. Therefore, this study evaluated the effects of the administration of this probiotic on cardiometabolic disorders induced by high fat diet in male Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Tested probiotic strain and cell suspension preparation

The *L. fermentum* 296 strain was gently supplied by the Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba (João Pessoa, Brazil). This strain was previously identified using 16S rRNA gene sequence analysis [21]. Stocks were stored at -20°C in de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 20 mL/100mL).

Preparation of *L. fermentum* 296

The bacterial suspension used in study was obtained from overnight cultures grown on MRS broth (HiMedia, Mumbai, India) and incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) at 37°C . Cells were harvested by centrifugation ($4500 \times g$, 15 min, 4°C), washed twice with sterile saline solution, re-suspended and homogenized using a vortex (30 s) in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions with optical density (OD) reading at 660 nm (OD_{660}) of 1.0, which provided viable counts of approximately $9 \log \text{CFU/mL}$.

In vitro Radical Scavenging Activity

The overnight culture of *L. fermentum* 296 was centrifuged ($10,000 \times g$ for 10 min at 4°C) to separate the cell-free culture supernatant and the cell pellets. The cell pellets were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) to reach a concentration of $1 \times 10^9 \text{CFU/mL}$ and served as intact cells. The radical scavenging capacity of *L. fermentum* 296 was evaluated using 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical assay [24].

One milliliter of intact cells was mixed with 1 mL of DPPH solution in methanol (0.2 mM). The mixture was vortexed for 30 s and left at room temperature in the dark for 30 min. The mixture of DPPH and deionized water served as the blank sample. The absorbance at 517 nm was recorded. The scavenging ability was defined using the following equation:

$$\text{scavenging effect (\%)} = [1 - A_{517(\text{sample})} / A_{517(\text{blank})}] \times 100\%$$

Ethical aspects and animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) at ± 90 days of age were maintained in collective polypropylene cages at controlled temperature ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), with humidity between 50-55%, with filtered water and diet *ad libitum*, in a 12-h light-dark cycle. All experimental procedures were submitted and approved by Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of the Federal University of Paraíba (CEUA-UFPB protocol 6080240418) and followed the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the International Principles for Biomedical Research involving Animals. All efforts were made to reduce the number and suffering of animals. Interventions with oral gavage were carried during the experiment in all groups.

Experimental design

The rats were randomly assigned into three groups: i) control group (CTL, $n = 8$) that received a commercial diet (Presence Purina®, Paulínea, Brazil); ii) dyslipidemic group (DLP, $n = 8$) that received a dyslipidemic diet Rhoster® Company (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brazil) and iii) dyslipidemic group that received *L. fermentum* 296 (DLP + Lf296, $n = 8$). In the CTL and DLP groups, saline solution was administered as placebo for 4 weeks. In the DLP + Lf296 group, *L. fermentum* 296 strain in a solution of approximately 1×10^9 CFU/mL was administered daily for 4 weeks. Administration of vehicle or *L. fermentum* 296 was performed by oral gavage. Daily food intake and body weight was weekly measured during all experiment using an appropriate scale (model AS-1000; Marte, Santa Rita MG, Brazil). After 4 weeks of treatment with saline or *L. fermentum* 296, biochemical measurements, glucose and insulin tolerance tests, baseline blood pressure, heart rate (HR) records, spectral analysis of systolic arterial pressure and cardiac interval, baroreflex sensitivity, sympathetic-vagal balance and sympathetic vascular tone were evaluated in each group.

Glucose and insulin tolerance test

The glucose tolerance (OGTT) and insulin tolerance (ITT) tests were performed on rats fasted overnight (12 h). In the OGTT, an oral load was administered via gavage of glucose (2 g/kg). Blood samples were taken from the tail veins before glucose administration and, subsequently, at 15, 30, 60, 90 and 120 min. OGTT and ITT were performed after 24 h, following an intraperitoneal insulin injection (0.75 UI/kg body weight); blood glucose concentrations was measured before (0 min) and after (30, 60, 90 and 120 min) the peritoneal

insulin injection. Measurements of blood glucose concentration were performed with an Accu-Check glucometer (Bayer®).

Assay for serum measurements

Serum measurements were performed 24 h after the glucose homeostasis experiments. The male rats were fasted overnight and blood samples were collected by orbital venous plexus disruption [25]. The blood was centrifuged at 5000 xg, 25 °C, for 15 min and serum measurements of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides concentrations were performed using appropriate enzymatic colorimetric kits according to the manufacturer instructions (Bioclin, Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil).

The concentration of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, was measured as an indicative of oxidative stress. Briefly, 400 µL of perchloric acid (7%) was added to 250 µL of serum, mixed and centrifuged at 6000 xg, 4 °C, during 20 min. The supernatant was collected, added to 400 µL of thiobarbituric acid (0.6%), heated at 100 °C during 1 h and read at 532nm. In this assay, MDA reacts with thiobarbituric acid to produce a red-coloured complex. [25].

Determination of baseline cardiovascular parameters

At least 48 h after the plexus retro-orbital disruption experiments, the rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) for insertion of polyethylene catheters into the femoral artery and vein. The catheters were tunneled through the back of the neck and ketoprofen (5 mg/kg) was injected subcutaneously.

Rats underwent a period of surgical recovery for 24 h. After this period, rats were healthy and without clinical signs of pain or distress. Arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were recorded in conscious animals connecting the arterial cannula to a pressure transducer (ML866 / P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), as previously described [26]. The pulsatile AP (PAP) and HR was recorded for 50-60 min under baseline conditions, and the values of the systolic AP (SAP), diastolic AP (DAP), mean AP (MAP) and HR were calculated off line by selection of 10 min for each animal (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia).

Using the same period of 10 min of baseline AP and HR records, the spectral analysis in the frequency domain of SAP and pulse interval (IP) were assessed using an appropriate computational software (CardioSeries-v.2.4; www.danielpenteado.com). The spectra of SAP were integrated in the LF (0.2-0.75 Hz) and the HF bands (0.75-3 Hz). In addition, LF/HF ratio

of the IP was used to assess the sympathovagal index. Lastly, the spontaneous baroreflex sensitivity (SBRS) was calculated using a sequence method [25]. The pulse interval was exported and analyzed with Kubios HRV Standard software version 3.0.2 (The Biomedical Signal and Medical Imaging Analysis Group, Department of Applied Physics, University of Kuopio, Finland). The heart rate variability (HRV) analysis was determined; 1) time-domain parameters: standard deviation between the duration of RR intervals (SDNN) and square root mean squared differences of successive RR intervals (RMSSD); 2) Nonlinear parameters (SD1 and SD2). Poincaré scatter plots were constructed and investigated as nonlinear tool, including the transverse axes (SD1, an indicator of parasympathetic activity) and the longitudinal axes (SD2, an function of sympathetic and vagal activity) [27].

Assessment of baroreflex control, cardiac autonomic function and sympathetic tone

After 60 min of PA and HR baseline recordings, the cardiovascular responses obtained to vasoactive drugs phenylephrine (8 mg/kg, i.v.) and sodium nitroprusside (25 mg/kg, i.v.) were used to assess the sensitivity of the baroreceptor, as previously described [28]. Reflex changes in heart rate produced by vasoactive drugs administration were quantified and plotted as changes in heart rate over changes in mean arterial pressure ($\Delta\text{HR}/\Delta\text{MAP}$). Data were analyzed by linear regression using Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and the slope of linear regression provided baroreflex sensitivity for each animal.

After the cardiovascular parameters have returned to baseline values (approximately 1 h after baroreflex evaluation), intravenous bolus injection of the muscarinic receptor antagonist methylatropine (2 mg/kg i.v.; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and the b-adrenoceptor antagonist propranolol hydrochloride (4 mg/mL/kg, i.v.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to assess cardiac autonomic function [28]. The interval of treatment between drugs was 10 min. The parasympathetic tone was evaluated by the change in basal HR caused by methylatropine, whereas the sympathetic tone was determined by the HR change after propranolol administration. After each sequence, the intrinsic heart rate was calculated.

The contribution of the sympathetic vascular tone to cardiovascular system in a new group of rats was assessed by an intravenous injection of the ganglionic blocker (hexamethonium, 30 mg/kg, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). The sympathetic tone was calculated by the changes in MAP (ΔMAP) following administration as described by Guimarães et al, 2019 [29]. At the end of the experiments, animals were euthanized with an overdose of ketamine (i.v.) and the organs (liver, spleen, heart) were collected and weighed.

Counts of *Lactobacillus* spp. in feces

Fecal samples were homogenized in peptone water (100 mg peptone/mL) and serially diluted in the same diluent. Twenty μ L aliquots of the respective dilutions were inoculated using a microdrop technique in MRS agar, followed by incubation at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). After an incubation period of 24-48 h, the number of colonies were counted, and the results were expressed as log CFU/g.

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Kolmogorov Smirnov test was used to assess the normality of data. The most of the variables required one-way ANOVA parametric test and Tukey post-test. In cases by which Kolmogorov Smirnov normality test failed, the Kruskal-Wallis nonparametric test, and followed by Dunn multiple comparison test was used. Two-way ANOVA was used in body weight, food intake and curves of the glucose and insulin tolerance test. Statistical analysis was performed using the computational software Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Difference was considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Radical Scavenging Activity of *L. fermentum* 296

The Intact cells of *L. fermentum* 296 showed high capacity to sequester the DPPH radical (**Figure 1**).

Body weight and food intake

The body weight was similar among groups during the experimental period (**Figure 2 A**). Daily food intake was reduced in rats fed a high fat diet (**Figure 2 B**).

Assessment of the glucose tolerance test (OGTT) and the insulin tolerance test (ITT)

Rats fed a high fat diet for 4 weeks exhibited greater area under curve (AUC) after oral glucose loading and insulin tolerance test in comparison to CTL group ($p < 0.05$, **Figure 3 A** and **B**). This result suggests that after consuming high fat diet for 4 weeks, rats became glucose intolerant and insulin resistant. The administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks did not cause reversion of the disruption of glucose homeostasis induced by the high fat diet (**Figure 3 A** and **B**).

Serum measurements

The experimental protocol based on a high fat diet intake was effective in developing dyslipidemia. The rats fed a high fat diet presented increased serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides when compared to the CTL group ($p < 0.05$, **Figure 4 A**, **B** and **E**). Administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks significantly reduced the serum levels of cholesterol, LDL and triglycerides ($p < 0.05$, **Figure 4 A**, **B** and **E**), but did not improve the serum levels of HDL-cholesterol in DLP rats (**Fig. 4 C**).

Serum MDA concentrations was higher in DLP rats when compared to CTL group ($p < 0.05$, **Figure 4 E**). The *L. fermentum* 296 administration did not reduce the serum MDA concentrations in DLP rats (**Figure 4 E**).

Cardiovascular parameters

Representative baseline recordings of PAP, SAP, DAP, MAP and HR from all groups are shown in **Figure 5 A**. SAP and MAP were increased in rats fed a high fat diet for 4 weeks when compared to CTL group ($p < 0.05$, **Figure 5 B** and **D**). Administration of *L. fermentum* 296 reduced SAP and HR in rats fed a high fat diet ($p < 0.05$, **Figure 5 B** and **E**).

Representative spectrum of SAP and cardiac interval from all groups are shown in **Figure 6 A and B**. LF of SAP, LF/HF ratio and SD2/SD1 of the cardiac interval were increased in rats fed a high fat diet for 4 weeks when compared to CTL group ($p < 0.05$, **Figure 6 C**). However, no difference were observed in HF ranges, SBRS, SDNN, RMSSD, SD1 and SD2 of SAP between DLP and CTL groups ($p \geq 0.05$, **Figure 6 C**). Administration of *L. fermentum* 296 reduced LF/HF ratio and SD2/SD1 of the cardiac interval in rats fed a high fat diet ($p < 0.05$, **Figure 6 C**) when compared to DLP group.

The **Figure 7 A** shows the original tracings from one representative animal of each group (CTL, DLP and DLP+Lf296) during the baroreceptor reflex. Rats from DLP group exhibited a reduction in BRS when compared to CTL rats ($p < 0.05$, **Figure 7 B - D**). The administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks did not prevent the baroreflex impairment in DLP rats (-2.7 ± 0.44 vs. -3.24 ± 0.35 bpm/mmHg, $p > 0.05$, **Figure 7 B - D**).

The effects of *L. fermentum* 296 on the cardiovascular autonomic modulation through tachycardic response to atropine (vagal tone) and bradycardic response to propranolol (sympathetic drive) was assessed through representative recordings (**Figure 8 A and B**). The vagal tone was reduced in DLP rats compared to CTL group (56.5 ± 7.1 vs. 102.8 ± 15.2 bpm, $p < 0.05$, **Figure 8 C**), while cardiac sympathetic drive was increased in DLP rats when compared with CTL group (-101 ± 9.3 vs. -52 ± 9.9 bpm, $p < 0.05$, **Figure 8 D**). In comparison to untreated DLP group, the administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks reduced the cardiac sympathetic tone (-60 ± 9.3 vs. -101 ± 9.3 bpm, $p < 0.05$, **Figure 8 D**), but the vagal tone of DLP rats was not recovered ($p > 0.05$, **Figure 8 C**). The intrinsic heart rate did not alter among groups ($p > 0.05$, **Figure 8 E**). These results suggest that probiotic *L. fermentum* 296 could reduce dysautonomia in DLP rats through the reduction of sympathetic tone. For this reason, the vasomotor sympathetic tone was evaluated using the pharmacological ganglionic blockage according to the representative recordings (**Figure 9 A**). A significant decrease in the fall in blood pressure induced by hexamethonium infusion in DLP rats treated with *L. fermentum* 296 was observed ($p < 0.05$, **Figure 9 B**), indicating that administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks reduces the vasomotor sympathetic drive and blood pressure in rats fed with high fat diet.

***Lactobacillus* spp. counts in feces**

Consumption of high fat diet reduced the counts of *Lactobacillus* spp. in feces of DLP rats compared to CTL group ($p < 0.05$, data in supplementary material, **Figure S1**). The

population of *Lactobacillus* spp. in feces of DLP rats increased with administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The intact cells of *L. fermentum* 296 showed greater ability to scavenge the free radical DPPH, this antioxidant activity of intact cells of *L. fermentum* 296 is probably related to cell surface compounds [24]. An earlier study reported that when the cell surface compounds of *L. plantarum* C88 isolated from Chinese fermented dairy tofu were enzymatically removed, a decrease in DPPH scavenging capacity was observed [30].

The consumption of the high fat diet did not induce weight differences between the groups, although the DLP diet was more caloric than the CTL diet. Similar to previous study [54], dyslipidemic rats had a decrease in food consumption, possibly due to the satietyogenic effect caused by the higher fat content of this diet [54].

The results of this study revealed that the administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks increased the counts of fecal *Lactobacillus* spp. in rats, suggesting that *L. fermentum* 296 is able to modulate positively the population of *Lactobacillus* spp. in the gut, as well as suggest that this strain could survive and colonize the gastrointestinal tract in adverse conditions such those imposed by the DLP diet, since the increased consumption of high fat and cholesterol diet contributes for the disruption of the gut microbiota homeostasis and gut dysbiosis [13].

A growing number of clinical and non-clinical studies has demonstrated that probiotic administration can restore the microbial balance, gut permeability and insulin resistance in rats fed a high fat diet [12, 31, 32]. Despite the reduction of approximately 15% in the glucose curves of OGTT and ITT, the administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks was not capable of restoring the glucose tolerance and insulin resistance in rats fed with high fat diet.

Our study demonstrated that administration of *L. fermentum* 296 successfully prevented the increase in the serum concentrations of TC, LDL-C and triglycerides induced by high fat diet consumption. Our results are in agreement with previous studies that have demonstrated that administration of a single probiotic strain [11, 33] or mixed probiotics formulation [34, 35] exerted hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects during high fat diet consumption.

Lactobacilli were reported to bind to cholesterol in the intestine and enhance excretion of cholesterol in feces, resulting in decrease total body cholesterol pool [36]. Indeed, colonic bacteria can produce propionate, a short chain fatty acid derived from the carbohydrate fermentative process, which act inhibiting the hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme synthase enzyme and, consequently, reducing the hepatic cholesterol synthesis [37]. *Lactobacillus* strains possess biliary acid hydrolase activities enabling the hydrolyze of bile salts and, secondarily, the reduction of cholesterol serum levels [38, 39]. In another hand,

Lactobacillus strains may also exert hypocholesterolemic effect through the cholesterol uptake and acceleration of cholesterol metabolism [33], as well as by converting cholesterol to coprostanol through the action of bacterial cholesterol reductase into the intestine and excretion of cholesterol directly into the feces. [40]. Lastly, *Lactobacillus* can reduce serum cholesterol through the coordinated regulation of cholesterol biosynthesis by down regulation of genes related to the synthesis and uptake of cholesterol (e.g., SREBP2) or increasing the cholesterol hepatic efflux [17]. Further studies focusing on molecular assays will help to elucidate the exact mechanism by which *L. fermentum* 296 prevented the dyslipidemia induced by dyslipidemic diet consumption.

The intake of the dyslipidaemic diet for 4 weeks i) impaired cardiac baroreflex control, ii) provoked dysautonomia and iii) increased arterial blood pressure in rats. These findings may be justified by the fact that dyslipidemia is a risk factor for activation of inflammatory cascade in endothelial cells through the release of cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 [41]. These cytokines stimulate the expression of adhesion molecules, such as MCP-1, ICAM and VCAM, which are involved in the increase of the endothelium adhesiveness, arterial stiffening, development of atherosclerotic lesions, sympathetic hyperactivity, baroreflex dysfunction and arterial hypertension [42-45].

Interestingly, administration of *L. fermentum* 296 for 4 weeks reduced sympathetic hyperactivity and blood pressure. However, despite of attenuating the baroreflex control, it failed to restore baroreflex proper functionality in dyslipidemic rats. Our findings are similar to previous studies that demonstrated that *Lactobacillus* strains administration helps to reduce systolic arterial pressure, vascular oxidative stress, vascular inflammation and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats [46, 47].

Reduction of blood pressure through probiotic supplementation can be attributed to the release of bioactive peptides during the fermentation of foods containing milk protein (casein), such as angiotensin converting enzyme inhibitor peptides, as well as the ability to inhibition of the production of proinflammatory cytokines [55].

Our pharmacological and spectral analysis studies indicated that *L. fermentum* 296 reduced sympathetic activity and blood pressure in dyslipidaemic rats, suggesting that this probiotic strain could have effects in the central nucleus involved with cardiovascular modulation. Mechanisms involved in these cardiovascular beneficial effects induced by *L. fermentum* 296, could be in the future better explored. Previous experimental [48-50] and clinical studies [51] have demonstrated that probiotic administration may be an important strategy to reduce sympathetic hyperactivity in hypertensive condition.

Although it has not yet been possible to establish the underlying mechanism by which *L. fermentum* 296 reduces sympathetic activity and blood pressure in rats fed a dyslipidemic diet, the increased production of short-chain fatty acids (SCFAs), which modulate vasodilatation and induce hypotension, has been proposed as possible mechanism associated with the induction of these effects by acid-producing probiotics [48, 53].

One hypothesis of the effects of *L. fermentum* 296 on the central nucleus involved with cardiovascular modulation is through acetate, the most abundant of the AGCCs, which, when produced in the intestine by *Lactobacillus*, passes through facilitates diffusion into the bloodstream and can activate signaling pathways through the activation of G protein coupled receptors [56], such as muscarinic receptors in the sinus node and the atrioventricular node of the heart [57], and in the brain in regions such as NTS and RVLM that control sympathetic activity for the heart and blood vessels [57] modulating heart rate and blood pressure.

In addition, *Lactobacillus* administration can modulate the human immune system by activating T-cells (Treg) and, consequently, increasing interleukin (IL)-10 production responsible for the inhibition of NADPH oxidase, the main source of reactive oxygen species (ROS) in the vasculature. These effects could improve endothelial function and reduces blood pressure [58].

The intestine is the most highly innervated peripheral organ with a significant number of motor fibers identified as sympathetic nerves. [16]. The intraduodenal injection of *L. johnsonii* La1 inhibited the adrenal sympathetic nerve and facilitated the gastric vagus nerve function in urethane anesthetized rats. The inhibition of the adrenal sympathetic nerve was associated with decreased secretion of adrenaline, glucagon and blood glucose levels [15].

In summary, inhibition of sympathetic tonus may be based on immunological or neural modulators produced in the intestinal microbiota, and transmitters produced by the intestinal microbiota (which via the vagus nerve pathway) could reach areas with no blood-brain barrier that are known to control sympathetic and vagal activity to the heart [57].

Future clinical studies should investigate the hypothesis that acute and chronic treatment with *L. fermentum* 296 can dampen sympathetic nervous activity in patients with dyslipidemia or arterial hypertension. If correct, this could be translated into new nutritional approaches to prevent or treat the cardiometabolic disease.

CONCLUSION

Administration of the potentially probiotic *L. fermentum* 296 strain for 4 weeks alleviates cholesterol and triglycerides serum levels in dyslipidemic rats. In addition, our study is the first to show that the administration of *L. fermentum* 296 effectively reduced sympathetic cardiovascular tone and systolic blood pressure in dyslipidemic rats, suggesting that *Lactobacillus fermentum* 296 administration could become an alternative strategy to prevent diet-induced hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia as well as their related cardiometabolic complications.

Additional information

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this study

Author contributions

RGSC and JLBA designed the research. RGSC, TMRA, MOLF, GAHF and LACA conducted the experiments. RGSC and JLBA analyzed the data and performed the statistical analysis. RGSC and JLBA had primary responsibility for the final content. MM, JCC, VAB, ELS and JLBA contributed to interpretation of the data and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Figure legends

Figure 1. Antioxidant activity of *L. fermentum* 296 based on DPPH scavenging assays. Lf 296 intact cells: suspension of *L. fermentum* 296 cells; PBS: phosphate buffered saline used as blank.

Figure 2. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on body weight and daily food intake.

(A) Gain of body weight and food intake (B) of the groups studied during the experiment. Body weight and food intake in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by two-way ANOVA, and followed by Bonferroni post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. $\Psi p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 3. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on glucose and insulin tolerance tests.

Area under curve (AUC) calculated from blood glucose values measured at different time point (0–120 min) during oral glucose (A) and insulin (B) tolerance tests in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 4. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on serum lipid profile and lipid peroxidation assay

Serum levels of total cholesterol (A), LDL-cholesterol (B), HDL-cholesterol (C), triglycerides (D) and TBARS (E) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. HDL-cholesterol was analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. $\Psi p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 5. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on resting blood pressure and heart rate

(A) Representative records of pulsatile blood pressure (PAP), systolic blood pressure (SAP), diastolic blood pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR). Resting SAP (B), DAP (C), MAP (D) and HR (E) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the DLP group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 6. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on spectral analysis of systolic arterial pressure (SAP) and heart rate variability (HRV).

(A) Representative spectra of SAP and cardiac interval (B). (C) Resting LF and HF bands of SAP, spontaneous baroreflex sensitivity (SBRS), LF/HF ratio, SDNN, RMSSD, SD1, SD2 and SD2/SD1 of cardiac interval in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. LF and HF components of SAP were analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the DLP group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296). SDNN (standard deviation between the duration of RR intervals); RMSSD (square root mean squared differences of successive RR intervals); SD1 (an indicator of parasympathetic activity); SD2 (an function of sympathetic and vagal activity).

Figure 7. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on baroreflex control

(A) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in response to phenylephrine (8 μ g/Kg, i.v., black arrows) and sodium nitroprusside (25 μ g/Kg, i.v., red arrows). Baroreflex assessment during the administration of phenylephrine (B), sodium nitroprusside (C) and baroreflex gain (D) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 8. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on cardiac autonomic modulation

(A - B) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in response to methylatropine (2 mg/kg i.v) and propranolol (4 mg/Kg, i.v.). Parasympathetic (C), sympathetic (D) tone and intrinsic heart rate (E) assessment in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. Parasympathetic tone was analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Figure 9. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on sympathetic tone

(A) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP) and mean arterial pressure (MAP) in response to ganglionic blockade with hexamethonium (30 μ g/Kg, i.v.). Assessment of delta change of the MAP (B) after blockade with hexamethonium in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

Supplementary Figure 1. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on fecal *Lactobacillus* counts. Assessment of fecal *Lactobacillus* counts in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

REFERENCES

- [1] Darroudi S, Fereydouni N, Tayefi M, Ahmadnezhad M, Zamani P, Tayefi B, et al. Oxidative stress and inflammation, two features associated with a high percentage body fat, and that may lead to diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Biofactors*. 2018.
- [2] Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129:S1-45.
- [3] Baghbani-Oskouei A, Tohidi M, Asgari S, Ramezankhani A, Azizi F, Hadaegh F. Serum Lipids During 20 Years in the Tehran Lipid and Glucose Study: Prevalence, Trends and Impact on Non-Communicable Diseases. *International journal of endocrinology and metabolism*. 2018;16:e84750.
- [4] Hannon BA, Thompson SV, An R, Teran-Garcia M. Clinical Outcomes of Dietary Replacement of Saturated Fatty Acids with Unsaturated Fat Sources in Adults with Overweight and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Control Trials. *Annals of nutrition & metabolism*. 2017;71:107-17.
- [5] Batista KS, Alves AF, Lima MDS, da Silva LA, Lins PP, de Sousa Gomes JA, 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. *The British journal of nutrition*. 2018;119:30-41.
- [6] Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS one*. 2012;7:e47713.
- [7] Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP. Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:9719584.
- [8] Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani JV, et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life sciences*. 2016;146:154-62.
- [9] Chobanyan-Jurgens K, Jordan J. Autonomic nervous system activity and inflammation: good ideas, good treatments, or both? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015;309:H1999-2001.
- [10] Chan SH, Chan JY. Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. *J Appl Physiol (1985)*. 2012;113:1921-8.
- [11] Yadav R, Khan SH, Mada SB, Meena S, Kapila R, Kapila S. Consumption of Probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018.
- [12] Cavalcanti Neto MP, Aquino JS, Romao da Silva LF, de Oliveira Silva R, Guimaraes KSL, de Oliveira Y, et al. Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? *Pharmacological research*. 2018;130:152-63.
- [13] Song JJ, Tian WJ, Kwok LY, Wang YL, Shang YN, Menghe B, et al. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1 on the gut microbiota of hyperlipidaemic rats. *The British journal of nutrition*. 2017;118:481-92.
- [14] Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, Araujo TG, Carvalho BM, Rocha GZ, et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2017;50:16-25.

- [15] Yamano T, Tanida M, Niijima A, Maeda K, Okumura N, Fukushima Y, et al. Effects of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on autonomic nerves and blood glucose in rats. *Life sciences*. 2006;79:1963-7.
- [16] Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circulation research*. 2017;120:312-23.
- [17] Kim B, Park KY, Ji Y, Park S, Holzapfel W, Hyun CK. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473:530-6.
- [18] Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*. 2000;84:197-215.
- [19] Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*. 2006;100:1171-85.
- [20] Campana R, van Hemert S, Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut pathogens*. 2017;9:12.
- [21] Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WC, de Sousa Oliveira K, Franco OL, et al. Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1371.
- [22] de Albuquerque TMR, Garcia EF, de Oliveira Araujo A, Magnani M, Saarela M, de Souza EL. In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2017.
- [23] Costa WKA, RamalhoBrandão L, ElenaMartino M, FernandesGarcia E, Alves AF, Souza EL, et al. Qualification of tropical fruit-derived *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotics acting on blood glucose and total cholesterol levels in Wistar rats. *Food Research International*. 2018;In press.
- [24] Cao Z, Pan H, Li S, Shi C, Wang S, Wang F, et al. In Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yunnan De'ang Pickled Tea. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018.
- [25] Guimaraes KSL, de Araujo EV, Aquino JS, Gadelha DA, Balarini CM, Costa-Silva JH, et al. Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. *The British journal of nutrition*. 2017;118:930-41.
- [26] de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *The British journal of nutrition*. 2014;111:606-15.
- [27] Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in public health*. 2017;5:258.
- [28] Carvalho-Galvao A, Ogunlade B, Xu J, Silva-Alves CRA, Mendes-Junior LG, Guimaraes DD, et al. Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:1513-27.
- [29] Guimaraes DD, Cruz JC, Carvalho-Galvao A, Zhuge Z, Marques SM, Naves LM, et al. Dietary Nitrate Reduces Blood Pressure in Rats With Angiotensin II-Induced Hypertension via Mechanisms That Involve Reduction of Sympathetic Hyperactivity. *Hypertension*. 2019:HYPERTENSIONAHA11812425.
- [30] Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food chemistry*. 2012;135:1914-9.
- [31] Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabhu P, Rokana N, Kumar R, et al. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *European journal of nutrition*. 2018;57:279-95.

- [32] Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Yasom S, Wanchai K, Suntornsaratoon P, et al. Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese-insulin resistant rats. *European journal of nutrition*. 2018.
- [33] Pan DD, Zeng XQ, Yan YT. Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the science of food and agriculture*. 2011;91:512-8.
- [34] Kim SJ, Park SH, Sin HS, Jang SH, Lee SW, Kim SY, et al. Hypocholesterolemic Effects of Probiotic Mixture on Diet-Induced Hypercholesterolemic Rats. *Nutrients*. 2017;9.
- [35] Xie N, Cui Y, Yin YN, Zhao X, Yang JW, Wang ZG, et al. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011;11:53.
- [36] Pigeon RM, Cuesta EP, Gililliand SE. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *Journal of dairy science*. 2002;85:2705-10.
- [37] Lin Y, Vonk RJ, Slooff MJ, Kuipers F, Smit MJ. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *The British journal of nutrition*. 1995;74:197-207.
- [38] Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72:1729-38.
- [39] Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European journal of clinical nutrition*. 2012;66:1234-41.
- [40] Costabile A, Buttarazzi I, Kolida S, Quercia S, Baldini J, Swann JR, et al. An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. *PloS one*. 2017;12:e0187964.
- [41] Webb NR. Getting to the core of atherosclerosis. *Nature medicine*. 2008;14:1015-6.
- [42] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340:115-26.
- [43] Cruz JC, Flor AF, Franca-Silva MS, Balarini CM, Braga VA. Reactive Oxygen Species in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Alter Sympathetic Activity During Metabolic Syndrome. *Frontiers in physiology*. 2015;6:384.
- [44] Hurtubise J, McLellan K, Durr K, Onasanya O, Nwabuko D, Ndisang JF. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2016;18:82.
- [45] Indumathy J, Pal GK, Pal P, Ananthanarayanan PH, Parija SC, Balachander J, et al. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, body fat mass and altered cardiometabolic profile in pre-obesity and obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 2015;64:1704-14.
- [46] Gomez-Guzman M, Toral M, Romero M, Jimenez R, Galindo P, Sanchez M, et al. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59:2326-36.
- [47] Yap WB, Ahmad FM, Lim YC, Zainalabidin S. *Lactobacillus casei* strain C1 attenuates vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2016;20:621-8.
- [48] Ganesh BP, Nelson JW, Eskew JR, Ganesan A, Ajami NJ, Petrosino JF, et al. Prebiotics, Probiotics, and Acetate Supplementation Prevent Hypertension in a Model of Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension*. 2018;72:1141-50.
- [49] Tanida M, Takada M, Kato-Kataoka A, Kawai M, Miyazaki K, Shibamoto T. Intragastric injection of *Lactobacillus casei* strain Shirota suppressed spleen sympathetic activation by

- central corticotrophin-releasing factor or peripheral 2-deoxy-d-glucose in anesthetized rats. *Neuroscience letters*. 2016;619:114-20.
- [50] Horii Y, Fujisaki Y, Fuyuki R, Misonou Y, Nagai K. Effect of *Lactobacillus delbrueckii* LAB4 on hepatic and pancreatic sympathetic nerve activity and blood glucose levels in rats. *Beneficial microbes*. 2019;1-8.
- [51] Usinger L, Ibsen H, Linneberg A, Azizi M, Flambard B, Jensen LT. Human in vivo study of the renin-angiotensin-aldosterone system and the sympathetic activity after 8 weeks daily intake of fermented milk. *Clinical physiology and functional imaging*. 2010;30:162-8.
- [52] de Brito Alves JL, de Sousa VP, Cavalcanti Neto MP, Magnani M, Braga VA, da Costa-Silva JH, et al. New Insights on the Use of Dietary Polyphenols or Probiotics for the Management of Arterial Hypertension. *Frontiers in physiology*. 2016;7:448.
- [53] Mortensen FV, Nielsen H, Mulvany MJ, Hesse I. Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. *Gut*. 1990;31:1391-4.
- [54] Pinheiro RO, Lins PP, de Carvalho JLP, de Araújo EV, Alves AF, de Alencar Pereira R, de Souza Aquino J. Maternal dyslipidaemic diet induces sex-specific alterations in intestinal function and lipid metabolism in rat offspring. *British Journal of Nutrition*, 2019;1–32.
- [55] Robles-Vera I, Toral M, Sánchez M, Romero M, Jiménez R, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Antihypertensive Effects of Probiotics. *Curr Hypertens Rep*, 2017; 19-26.
- [56] Shubitowski T, Poll B, Natarajan N, Pluznick JL. Short-chain fatty acid delivery: assessing exogenous administration of the microbiome metabolite acetate in mice. *Physiological Reports*, 2019.
- [57] Vasquez E, Meyrelles S, Gava A, Campagnaro BP, Gil-Longo J, Campos-Toimil M, Pereira TMC. Beneficial effects of the synbiotic kefir on the neural control of cardiovascular function. *Journal Food Microbiol*. 2018; 10-18.
- [58] Robles-Vera I, Toral M, Visitación N, Sánchez M, Romero M, Jiménez R, Olivares M, Duarte J. The probiotic *Lactobacillus fermentum* prevents dysbiosis and vascular oxidative stress in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide blockade. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018; 1-36.

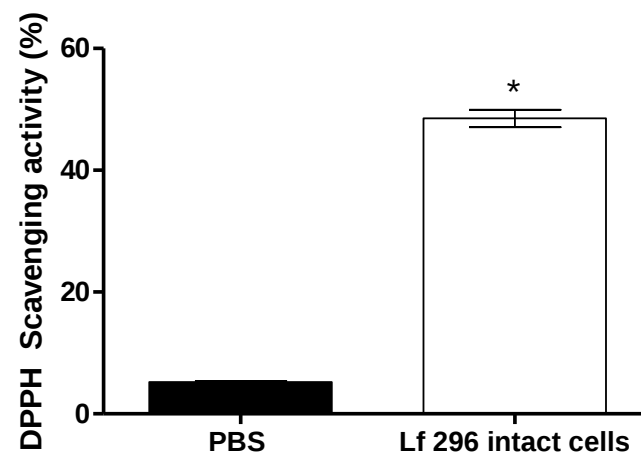


Figure 1. Antioxidant activity of *L. fermentum* 296 based on DPPH scavenging assays. Lf 296 intact cells: suspension of *L. fermentum* 296 cells; PBS: phosphate buffered saline used as blank.

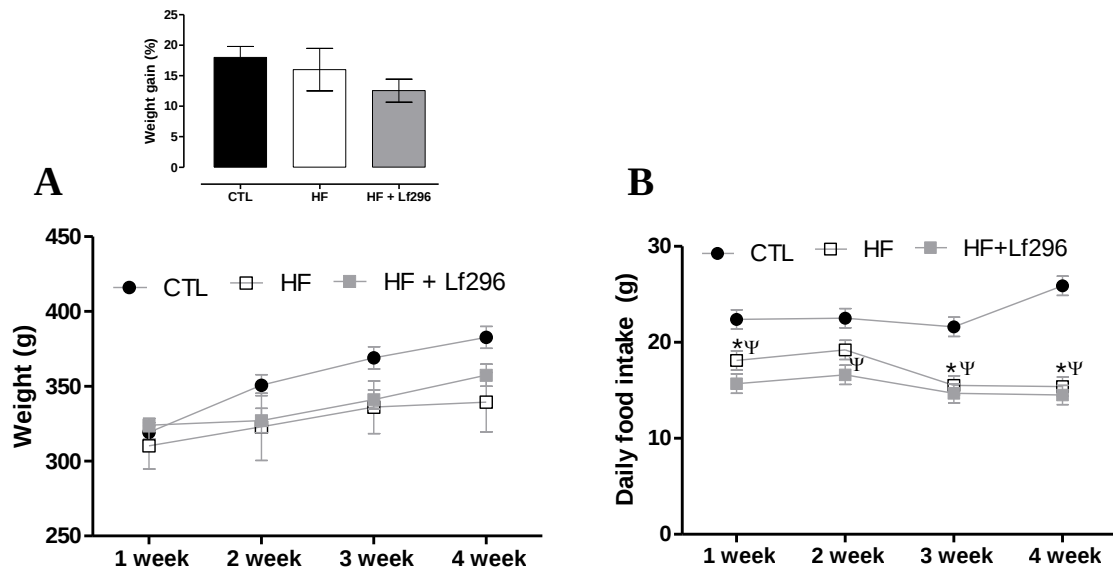


Figure 2. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on body weight and daily food intake.

(A) Gain of body weight and food intake (B) of the groups studied during the experiment. Body weight and food intake in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by two-way ANOVA, and followed by Bonferroni post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. $\Psi p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

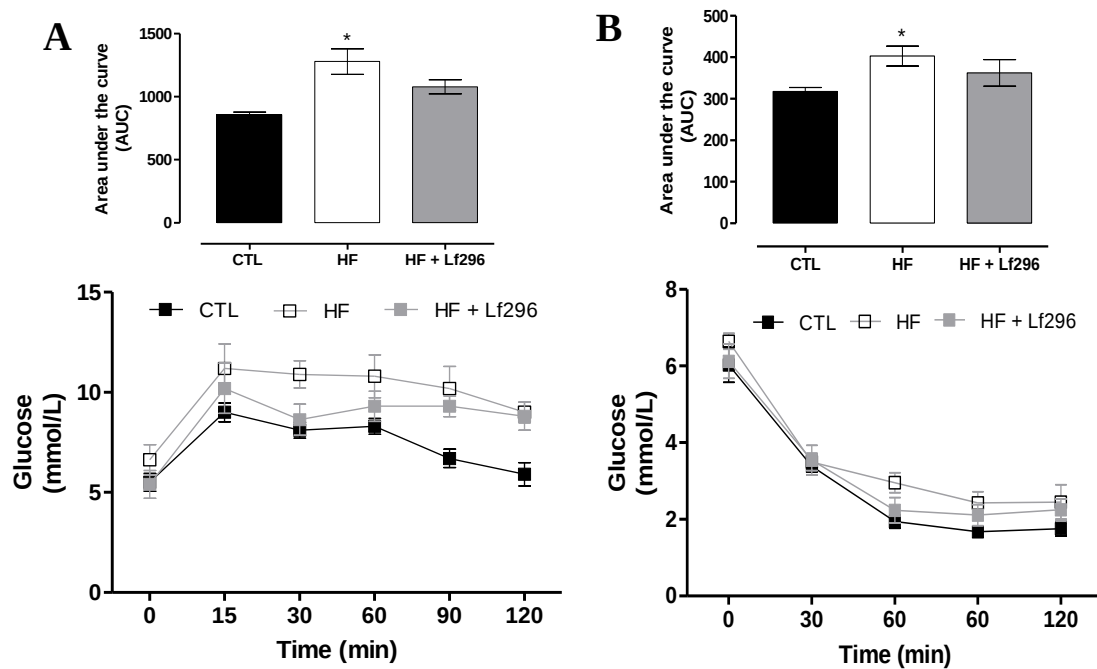


Figure 3. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on glucose and insulin tolerance tests. Area under curve (AUC) calculated from blood glucose values measured at different time point (0–120 min) during oral glucose (A) and insulin (B) tolerance tests in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

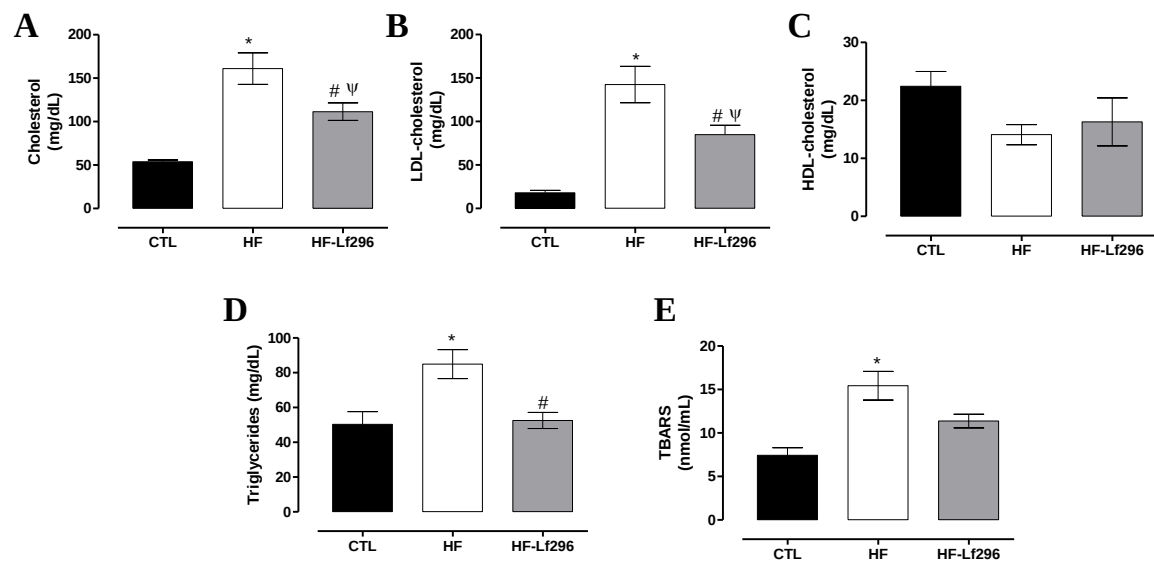


Figure 4. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on serum lipid profile and lipid peroxidation assay

Serum levels of total cholesterol (A), LDL-cholesterol (B), HDL-cholesterol (C), triglycerides (D) and TBARS (E) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. HDL-cholesterol was analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. $\Psi p < 0.05$ compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

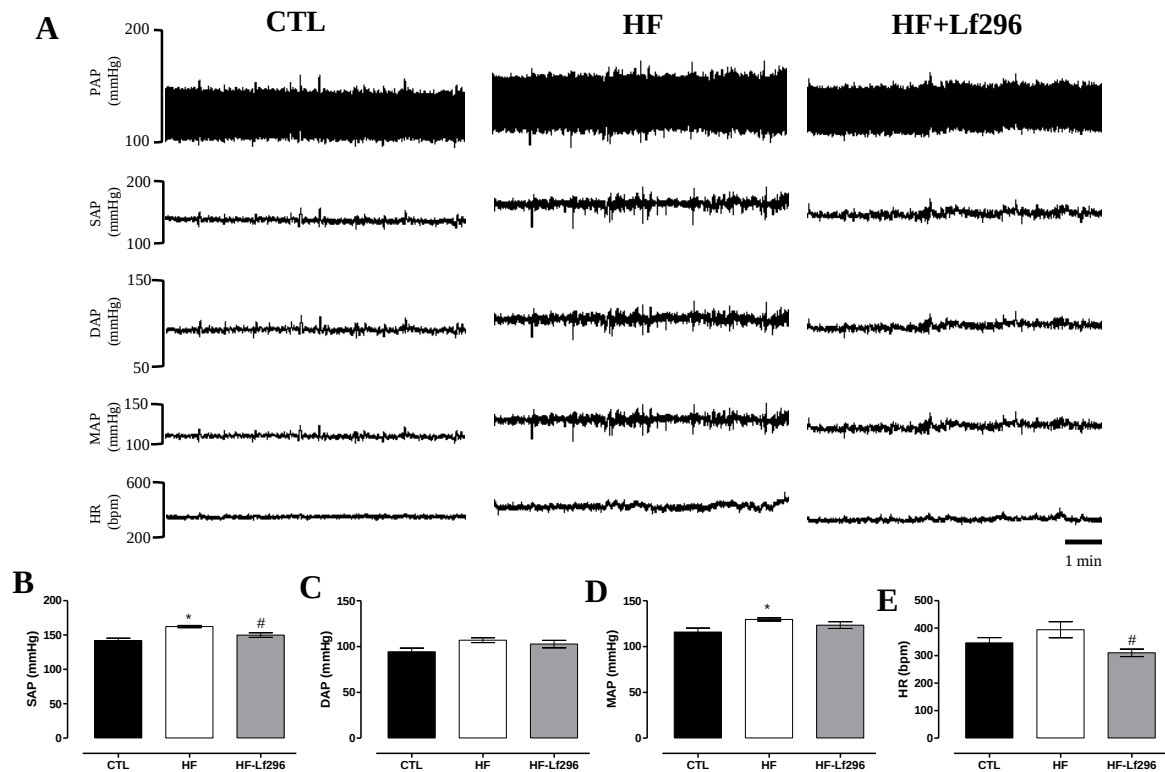


Figure 5. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on resting blood pressure and heart rate
 (A) Representative records of pulsatile blood pressure (PAP), systolic blood pressure (SAP), diastolic blood pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR). Resting SAP (B), DAP (C), MAP (D) and HR (E) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the DLP group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

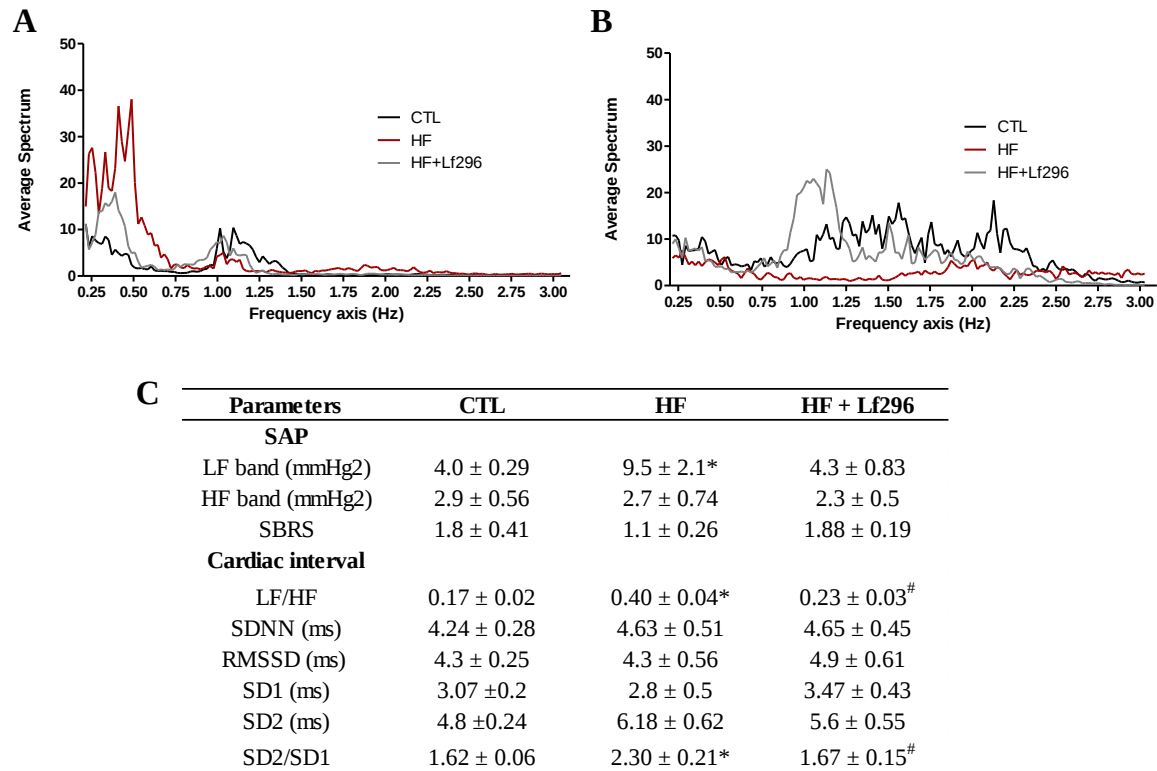


Figure 6. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on spectral analysis of systolic arterial pressure (SAP) and heart rate variability (HRV).

(A) Representative spectra of SAP and cardiac interval (B). (C) Resting LF and HF bands of SAP, spontaneous baroreflex sensitivity (SBRS), LF/HF ratio, SDNN, RMSSD, SD1, SD2 and SD2/SD1 of cardiac interval in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean ± SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. LF and HF components of SAP were analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. [#] $p < 0.05$ compared with the DLP group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296). SDNN (standard deviation between the duration of RR intervals); RMSSD (square root mean squared differences of successive RR intervals); SD1 (an indicator of parasympathetic activity); SD2 (an function of sympathetic and vagal activity).

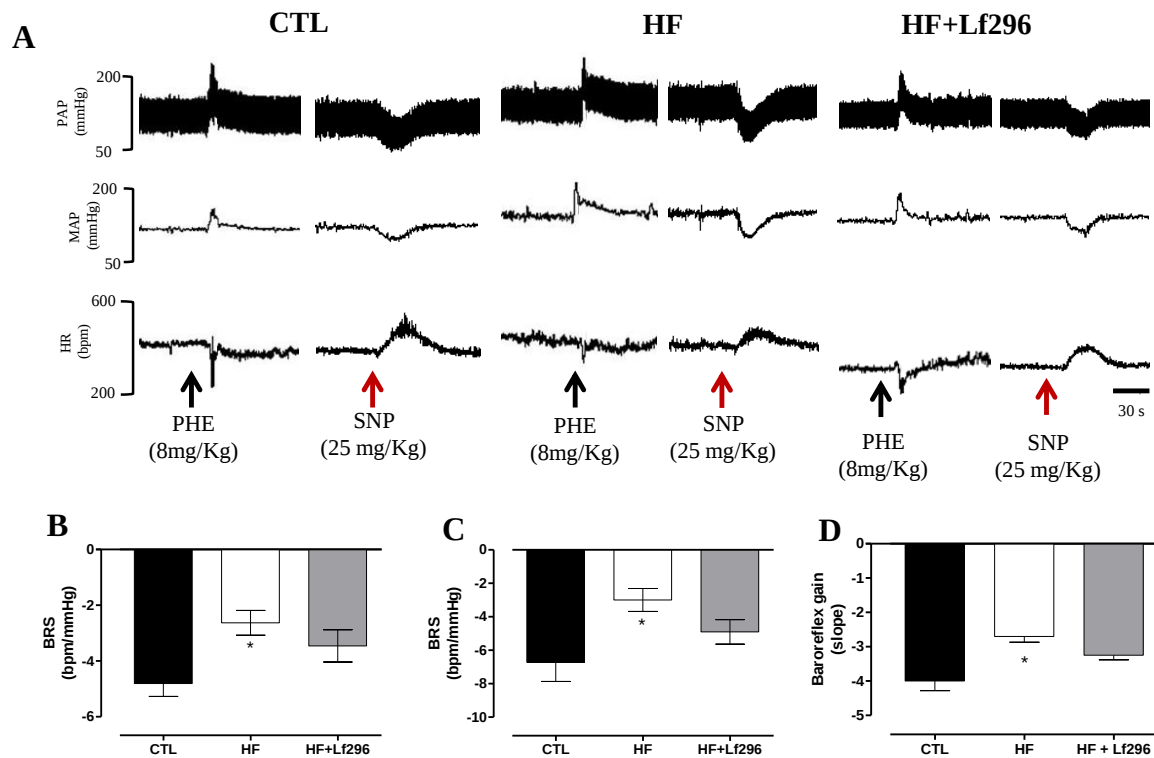


Figure 7. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on baroreflex control

(A) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in response to phenylephrine (8 μ g/kg, i.v., black arrows) and sodium nitroprusside (25 μ g/kg, i.v., red arrows). Baroreflex assessment during the administration of phenylephrine (B), sodium nitroprusside (C) and baroreflex gain (D) in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * p <0.05 compared with the CTL group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

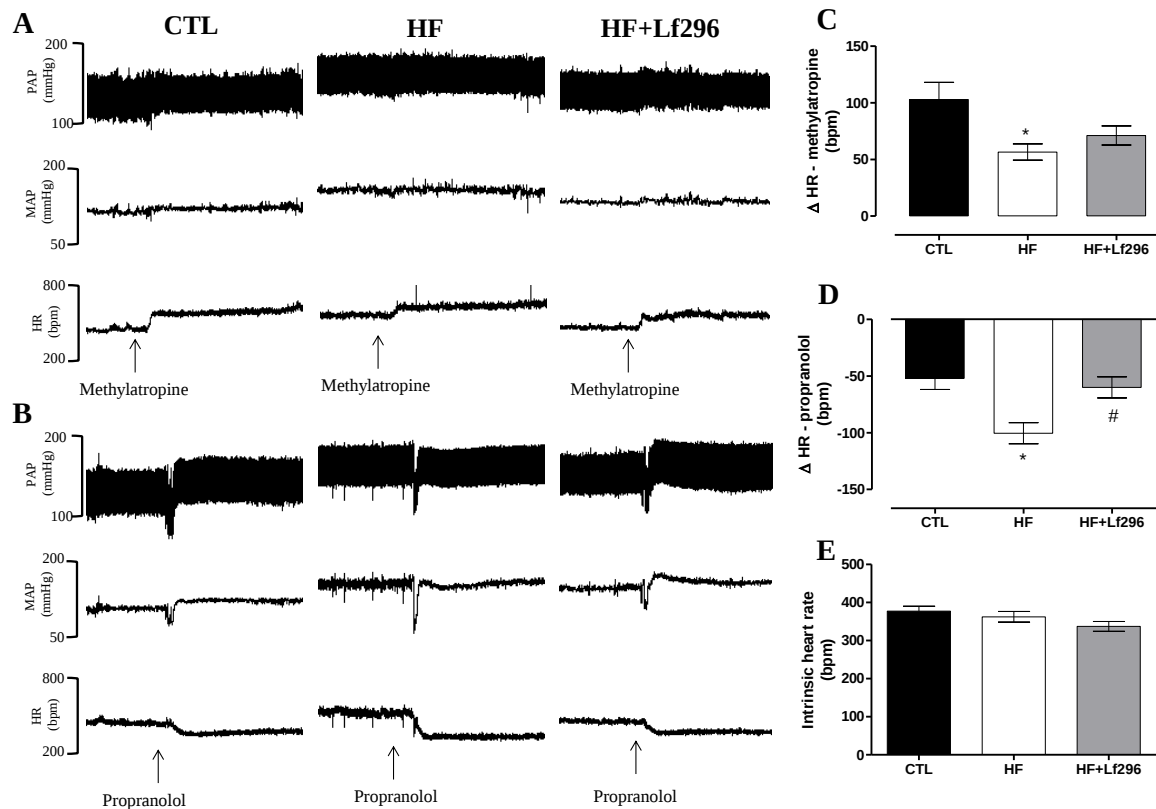


Figure 8. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on cardiac autonomic modulation

(A - B) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in response to methylatropine (2 mg/kg i.v.) and propranolol (4 mg/kg, i.v.). Parasympathetic (C), sympathetic (D) tone and intrinsic heart rate (E) assessment in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. Parasympathetic tone was analyzed by the Kruskal-Wallis test, and followed by Dunn post-test * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

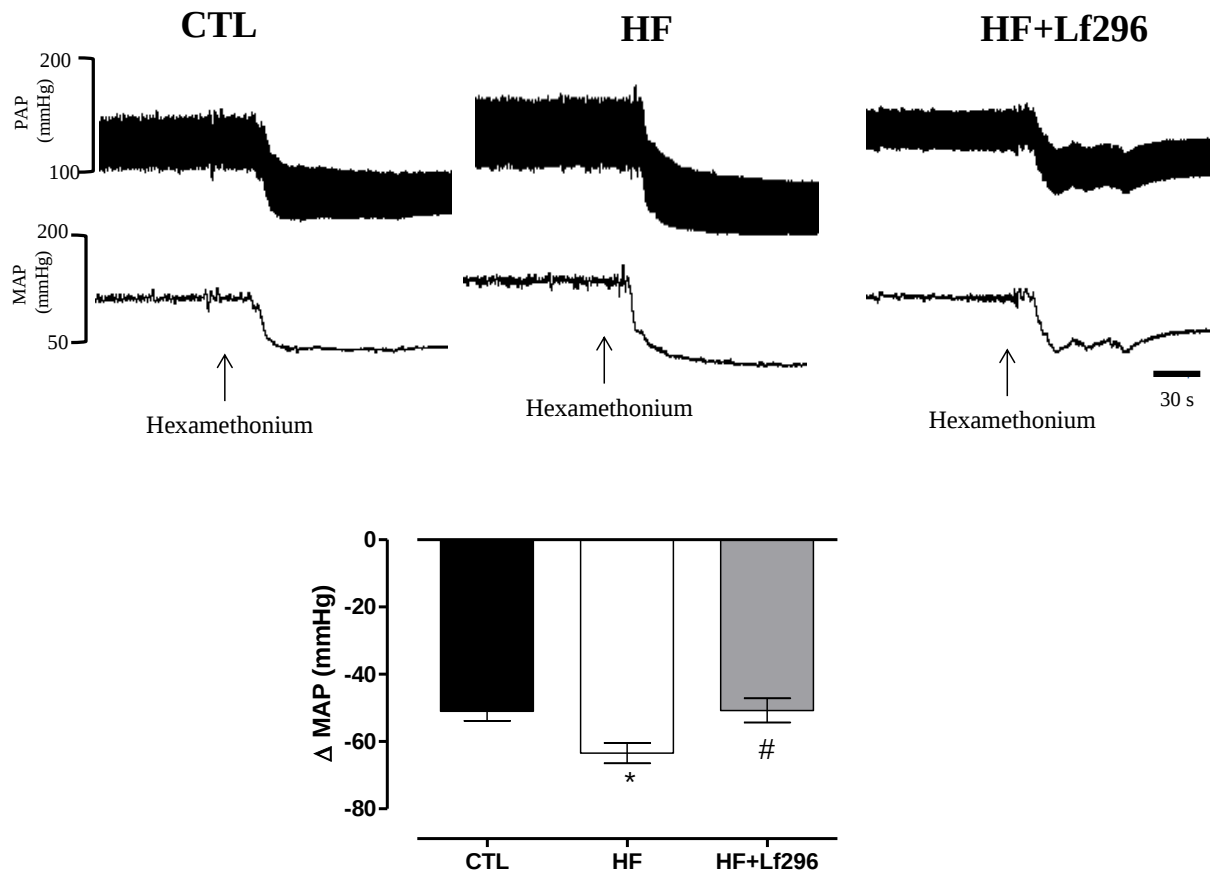
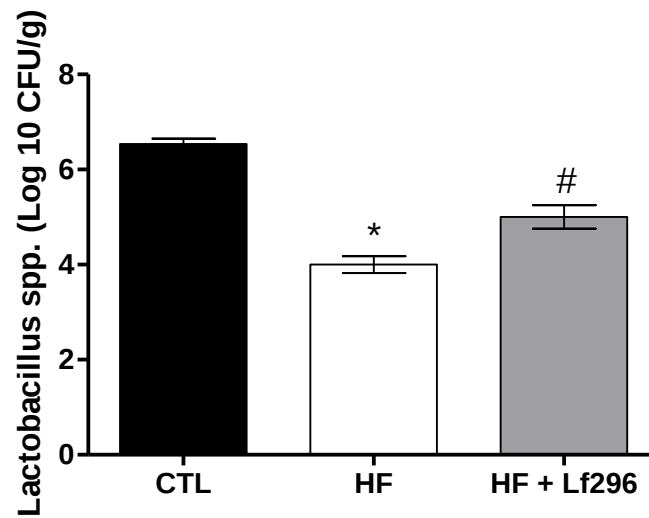


Figure 9. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on sympathetic tone

(A) Original tracings from one representative animal of each group (CTL, HF and HF+Lf296) showing changes in pulse arterial pressure (PAP) and mean arterial pressure (MAP) in response to ganglionic blockade with hexamethonium (30 μ g/kg, i.v.). Assessment of delta change of the MAP (B) after blockade with hexamethonium in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).



Supplementary Figure 1. Effects of *L. fermentum* 296 treatment on fecal Lactobacillus counts. Assessment of fecal Lactobacillus counts in placebo or *L. fermentum* 296-treated dyslipidemic rats. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8 per group), analyzed by one-way ANOVA, and followed by Tukey post-test. * $p < 0.05$ compared with the CTL group. # $p < 0.05$ compared with the HF group. CTL (control group); HF (high fatty group); HF + Lf296 (high fatty group treated with *L. fermentum* 296).

ANEXO

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO (CEUA)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *Lactobacillus fermentum* 263 e 296 EXTRAÍDOS DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS EM RATOS DISLIPIDÊMICOS", protocolada sob o CEUA nº 6080240418 (ID 000248), sob a responsabilidade de **José Luiz de Brito Alves e equipe**; Raissa Georgianna Silva Cavalcante - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 06/07/2018.

We certify that the proposal "EFFECTS OF THE SUPPLEMENTATION OF *Lactobacillus fermentum* 263 and 296 EXTRACTED FROM THE BYPRODUCT OF FRUIT PROCESSING ON CARDIOMETABOLIC PARAMETERS IN DISLIPIDEMIC RATS", utilizing 96 Heterogenic rats (48 males and 48 females), protocol number CEUA 6080240418 (ID 000248), under the responsibility of **José Luiz de Brito Alves and team**; Raissa Georgianna Silva Cavalcante - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/06/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **04/2020**

Área: **Nutrição**

Origem:	Unidade de Produção Animal - IPeFarM			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 80 a 100 dias N: 48
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			Peso: 250 a 300 g
Origem:	Unidade de Produção Animal - IPeFarM			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 80 a 100 dias N: 48
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			Peso: 190 a 230 g

Local do experimento: Laboratório de controle cardiovascular e hipertensão arterial (LACONCHA)

João Pessoa, 09 de julho de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba