

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

MICAELLE OLIVEIRA DE LUNA FREIRE
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE BRITO ALVES

**FORMULAÇÃO PROBIÓTICA DE *Lactobacillus fermentum* ATENUA DISLIPIDEMIA,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM UMA
DIETA HIPERLIPÍDICA**

JOÃO PESSOA – PB

2021

MICAELLE OLIVEIRA DE LUNA FREIRE

**FORMULAÇÃO PROBIÓTICA DE *Lactobacillus fermentum* ATENUA DISLIPIDEMIA,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM UMA
DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação para defesa a nível de
mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas, da Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito
Alves

**JOÃO PESSOA - PB
2021**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F866f Freire, Micaelle Oliveira de Luna.

Formulação probiótica de *Lactobacillus fermentum* atenua dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica / Micaelle Oliveira de Luna Freire. - João Pessoa, 2021.

87 f. : il.

Orientação: José Luiz de Brito Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Dislipidemia. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. Microbiota intestinal. 5. *Lactobacillus*. 6. Probióticos. I. Alves, José Luiz de Brito. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.397(043)

Elaborado por WALQUELINE DA SILVA ARAUJO - CRB-15/514



PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Ata da Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 07 de Junho de 2021.

Na data de sete de junho do ano de dois mil e vinte e um, às 13h (horário local), foi realizada remotamente através da plataforma Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **Micaelle Oliveira de Luna Freire**, com o trabalho intitulado FORMULAÇÃO PROBIÓTICA DE LACTOBACILLUS FERMENTUM ATENUA DISLIPIDEMIA, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA. A banca examinadora foi constituída pelo orientador Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (UFPB) na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia (USP), 2º examinadora (examinador interno) Profa. Dra. Camille de Moura Balarini (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

José Luiz de Brito Alves

Prof. Dr. José Luiz de Brito

Camille de Moura Balarini

Profª. Drª. Camille de Moura Balarini

William Tadeu Lara Festuccia

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu saúde física e mental para enfrentar os desafios do mestrado, especialmente nesse período difícil que estamos vivendo.

De forma especial, ao meu orientador, professor José Luiz, por ter me acolhido desde a iniciação científica. Tenho uma admiração desde a chegada do professor no laboratório, por suas inúmeras qualidades, dentre elas, a paciência para ensinar, a perseverança para a pesquisa, apesar de todos os obstáculos, sua humildade, que todos admiram, e por sempre extrair o melhor de seus orientandos.

Aos membros da Banca Examinadora, professores William Festuccia e Camille Balarini, pela disponibilidade em contribuir para minha dissertação.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, por todo suporte para conclusão desse trabalho. Aos laboratórios colaboradores, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição (UFPB), ao Laboratório de Nutrição Experimental (UFPB), ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (UFPB), ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e ao Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício Físico (UFPE). Também agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A minha mãe Marne, e minhas irmãs Gabriella e Emanuelle, que são minha base, os amores da minha vida, e estavam comigo em todos os momentos, de alegrias, estresse e desespero.

A toda minha família, em especial, minha avó Marlene, que a vida toda me deu todo suporte nos meus estudos, e ao meu falecido avô, José Paulo, que eu queria mais que tudo que estivesse presente nesse momento. Ao meu pai Ernesto, que sempre deu incentivo para minha vida profissional. E aos meus tios, Alisson, Marleide, Josélio e Zé Paulo por todo suporte. Aos meus primos, principalmente, minha prima irmã Mirelle, que sempre esteve comigo, e me apoia em todos os meus planos.

Ao meu namorado Rodrigo, que foi a pessoa que mais me deu suporte em absolutamente todos os momentos do mestrado, com muito amor e paciência para aguentar meus desesperos.

Ao meu tio e colaborador Alisson Macário, que foi a pessoa em quem sempre me espelhei para os estudos, que me despertou a vontade em ser da pesquisa, me apresentou laboratórios, e em quem posso confiar para tudo da minha vida.

Aos colaboradores desse trabalho, principalmente Kataryne Árabe, que me ajudou com as cepas probióticas, e a Luciana, que se tornou uma grande amiga, que estava comigo todos os dias, tanto nos experimentos iniciais, quanto nos experimentos em Pernambuco, e ainda, proporcionou suporte nas dúvidas, no trabalho e na apresentação.

A todos os membros do LACONCHA, aos técnicos de laboratório, Matheus, Sara e Clenia, que sempre forneceram o suporte necessário para a rotina do laboratório. Aos meus amigos do LACONCHA, principalmente, para nosso grupo FunLab, que foram essenciais no decorrer do mestrado, em especial, ao meu gêmeo Mickael, Anderson, Camila, Larissa, Danilo e Sara.

Aos membros do meu grupo de pesquisa, LANUHAS, principalmente, aos meus grandes amigos Luciana, Lucas, Emmanuel e Keyth.

Aos meus amigos que ganhei na graduação e estão comigo para todos os momentos da minha vida, Matheus Nóbrega, Mateus Carneiro, Ludymilla, Lívia, Nayanna, Kaliny, Rayanne, Anny Michelle e Yanny.

As minhas amigas do ensino médio, Bia e Ingrid, e em especial, minha melhor amiga Gabriella, que aguentou todas as minhas inseguranças e desesperos durante esse período.

RESUMO

O desequilíbrio da microbiota intestinal (MI) induzido por uma dieta rica em gordura vem sendo associado ao desenvolvimento de distúrbios cardiometabólicos. Alguns estudos demonstraram possíveis métodos para manter a homeostase da MI, sendo a administração com probióticos uma das escolhas para utilização de intervenção não-farmacológica. Esses compostos são conhecidos por contribuir para saúde do hospedeiro, através de suas propriedades hipocolesterolêmicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo ser uma estratégia promissora para o tratamento de doenças metabólicas e cardiovasculares. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da administração oral de uma formulação probiótica contendo *Lactobacillus fermentum* 139, 263 e 296 nos parâmetros bioquímicos, inflamação e estresse oxidativo em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Para isso, os ratos foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (dieta controle + placebo), grupo HFHC (dieta rica em lipídeos e colesterol + placebo), e grupo HFHC + Lf (dieta rica em lipídeos e colesterol + *L. fermentum* 139, 263 e 296). Esses grupos foram submetidos à suplementação com solução placebo ou *L. fermentum* 139, 263 e 296, por 4 semanas, duas vezes ao dia. A avaliação de peso corporal e consumo alimentar ocorreu durante todo experimento, e após 4 semanas de suplementação, ocorreu coleta de soro, tecidos do cólon e coração, e fezes, para realização de: mensuração sérica de perfil lipídico e citocinas inflamatórias, quantificação de ácidos orgânicos e açúcares nas fezes dos animais, além de avaliação de malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas antioxidantes e grupamentos tióis totais em tecidos do cólon e coração. Os resultados do presente estudo demonstraram que o grupo HFHC-Lf apresentou redução dos níveis séricos de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG), e redução de lipoproteína de alta densidade (HDL), além de reduzir os índices aterogênicos quando comparado ao grupo dislipidêmico. A administração com *L. fermentum* 139, 263 e 296 promoveu redução de IL-1 β e aumento de IL-10. A administração com *L. fermentum* 139, 263 e 296 contribuiu para o aumento de rafinose nas fezes, mas sem alterações significativas na frutose e ácidos graxos de cadeia curta. Adicionalmente, a suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 foi capaz de reduzir as concentrações de MDA e aumentar atividade de superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e grupamentos tióis totais no cólon, e ainda, promover aumento da atividade de catalase (CAT), GST e quantidade de grupamentos tióis totais nos tecidos cardíacos. Portanto, estes resultados indicam os efeitos potenciais promovidos por *L. fermentum* 139, 263 e 296 em parâmetros bioquímicos, além das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dessas cepas probióticas, podendo ser utilizadas como possíveis agentes terapêuticos em distúrbios cardiometabólicos.

Palavras-chave: Dislipidemia. Estresse oxidativo. Inflamação. Microbiota intestinal. *Lactobacillus*. Probióticos.

ABSTRACT

The imbalance of the intestinal microbiota (IM) induced by a high fat diet has been associated with the development of cardiometabolic disorders. Some studies have demonstrated possible methods for maintaining IM homeostasis, with administration with probiotics being one of the choices for using non-pharmacological intervention. These compounds are known to contribute to the health of the host, through their hypocholesterolemic, anti-inflammatory and antioxidant properties, and can be a promising strategy for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. The present study aimed to investigate the effects of oral administration of a probiotic formulation containing *Lactobacillus fermentum* 139, 263 and 296 on the biochemical parameters, inflammation and oxidative stress in rats fed a high-fat diet. The rats were divided into three experimental groups: control group (control diet + placebo), HFHC group (diet rich in lipids and cholesterol + placebo), and group HFHC + Lf (diet rich in lipids and cholesterol + *L. fermentum* 139, 263 and 296). These groups were submitted to supplementation with placebo solution or *L. fermentum* 139, 263 and 296, for 4 weeks, twice a day. The evaluation of body weight and food consumption occurred throughout the experiment, and after 4 weeks of supplementation, serum, colon and heart tissues and feces were collected to perform: measurement of serum lipid profile and inflammatory cytokines, quantification of acids organics and sugars in animal feces, in addition to evaluation of malondialdehyde (MDA) and activity of antioxidant enzymes and total thiol groups in colon and heart tissues. The results of the present study demonstrated that supplementation improved body weight and food consumption when compared to the HFHC group. The HFHC-Lf group showed a reduction in serum levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides (TG), and a reduction in high-density lipoprotein (HDL), in addition to reducing atherogenic indices when compared to dyslipidemic group. Administration with *L. fermentum* 139, 263 and 296 reduced IL-1 β and increased IL-10. The administration with *L. fermentum* 139, 263 and 296 contributed to the increase in raffinose in the feces, but without significant changes in fructose and short-chain fatty acids. In addition, supplementation with *L. fermentum* 139, 263 and 296 was able to reduce MDA concentrations and increase superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and total thiol groups in the colon, and promote increased catalase activity (CAT), GST and amount of total thiol groups in cardiac tissues. Therefore, these results indicate the potential effects promoted by *L. fermentum* 139, 263 and 296 on biochemical parameters, in addition to the anti-inflammatory and antioxidant properties of these probiotic strains, which can be used as possible therapeutic agents in cardiometabolic disorders.

Keywords: Dyslipidemia. Oxidative stress. Inflammation. Intestinal microbiota. *Lactobacillus*. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre mecanismos da disbiose induzida por HFD no estresse oxidativo e inflamação

Figura 2. Resumo do desenho experimental do estudo

Figura 3. Peso corporal e consumo dietético dos grupos CTL, HFHC e HFHC-Lf

Figura 4. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 no perfil lipídico de ratos dislipidêmicos

Figura 5. Efeitos da suplementação de *L. fermentum* 139, 263 e 296 no estresse oxidativo do cólon de ratos dislipidêmicos

Figura 6. Quantificação de frutose, rafinose e AGCC nas fezes

Figura 7. Correlação entre propionato e perfil lipídico

Figura 8. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 E 296 em marcados inflamatórios no soro dos animais

Figura 9. Correlação entre citocinas inflamatórias e níveis de LDL-c e entre propionato e citocinas inflamatórias

Figura 10. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 em parâmetros oxidativos em tecidos do coração

Figura 11. Resumo sobre os resultados da suplementação de *L. fermentum* 139, 263 e 296 ou PBS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AIN	American Institute of Nutrition
AIP	Índice aterogênico do plasma
BSH	Hidrolase dos sais biliares
CEUA	Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CRI-II	Índice de Risco II de Castelli
CRR	Razão de risco cardíaco
CT	Colesterol total
CTL	Controle
CYP7A1	Colesterol 7 α -hidroxilase
DAC	Doença arterial coronariana
DCVs	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPCRs	Receptores acoplado à Proteína G
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDAC	Histonas desacetilases
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HFD	Dieta rica em gordura
HFHC	Dieta rica em gordura e colesterol
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
IAM	Infarto agudo do Miocárdio
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído

MI	Microbiota intestinal
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OLFR78	Olfatório murino 78
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
RNA	Ácido ribonucleico
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TGI	Trato gastrointestinal
TLR4	Toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína
LPL	Lipase lipoproteica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 DISLIPIDEMIA E SUAS IMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES.....	18
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL	21
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E SUAS IMPLICAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS E NO ESTRESSE OXIDATIVO	25
2.4 PROBIÓTICOS.....	29
2.5 PROBIÓTICOS E DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS	33
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2 DIETA.....	42
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
4.4 CEPAS PROBIÓTICAS	44
4.5 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO PROBIÓTICA	44
4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	45
4.6.1 MENSURAÇÃO DE PESO E CONSUMO DIETÉTICO.....	45
4.6.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	45
4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, AÇÚCARES E OLIGOSSACARÍDEOS NAS FEZES	45
4.6.4 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS	46
4.6.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	46
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5. RESULTADOS	49
5.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. FERMENTUM</i> 139, 263 E 296 NO PESO CORPORAL E CONSUMO DIETÉTICO DOS ANIMAIS	49
5.2 A SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. FERMENTUM</i> 139, 263 E 296 MELHOROU PERFIL LIPÍDICO E ÍNDICES ATEROGÊNICOS DE RATOS DISLIPIDÊMICOS	50
5.3 A SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. FERMENTUM</i> 139, 263 E 296 MELHOROU ESTRESSE OXIDATIVO DE TECIDOS DO CÓLON DE RATOS DISLIPIDÊMICOS	52
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE FRUTOSE, RAFINOSE E AGCC NAS FEZES DOS GRUPOS CTL, HFHC E HFHC-Lf	54
5.5 CORRELAÇÃO ENTRE PROPIONATO E MARCADORES DE DISLIPIDEMIA.....	55

5.6	A SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. FERMENTUM</i> 139, 263 E 296 MELHOROU INFLAMAÇÃO DE BAIXO GRAU DE RATOS DISLIPIDÊMICOS	56
5.7	CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E CONCENTRAÇÃO DE LDL-C E ENTRE PROPIONATO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	57
5.8	A SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. FERMENTUM</i> 139, 263 E 296 FOI EFICAZ NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM TECIDOS DO CORAÇÃO DE RATOS DISLIPIDÊMICOS	59
6.	DISCUSSÃO	62
7.	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A alta prevalência de doenças cardiovasculares (DCVs) e metabólicas provoca grande impacto na saúde pública do mundo. A hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo II (DM2) e as dislipidemias são exemplos de condições clínicas adversas, consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de DCVs como, doença coronariana, acidente vascular encefálico e insuficiência cardíaca (LANDSBERG et al., 2013).

A etiologia dos distúrbios cardiovasculares e metabólicos é complexa, e pode ser subjacente a alterações genéticas, ambientais, nutricionais e/ou comportamentais (LANDSBERG et al, 2013.; NG et al., 2014). Estudos relataram que alterações na microbiota intestinal (MI) induzida pelo consumo de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas podem ser relacionadas com o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (ARON-WISNEWSKY et al., 2020; WARMBRUNN et al., 2020). Por exemplo, foi observado que uma dieta rica em gordura, do inglês High Fat Diet (HFD), promove alterações na composição dos microrganismos intestinais, que podem ser envolvidas com o aparecimento de dislipidemias, obesidade, DM2, HAS e DCVs (CAVALCANTE et al., 2019; ORTEGA et al., 2020).

A disbiose intestinal consiste no desequilíbrio da estrutura, função e diversidade da MI, e pode ser provocada pela exposição à HFD (CARDING et al., 2015; SONG et al., 2017). Um dos prejuízos causados pela disbiose consiste no aumento de estresse oxidativo, que parece estar envolvido com aumento da permeabilidade intestinal, que por sua vez, favorece a entrada de compostos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea, provocando desenvolvimento da inflamação (WEISS et al., 2017). A inflamação representa uma das manifestações clínicas encontradas nas doenças crônicas, com grande relevância na patogênese dessas condições clínicas (HUSSAIN et al., 2016).

Evidências crescentes têm investigado sobre possíveis métodos para manter a homeostase da MI, representando uma nova direção de pesquisa para a prevenção e tratamento de DCVs, conhecida como ‘teoria entérico-cardíaca’ (ZHU et al., 2020). Dentre as intervenções não-farmacológicas, a suplementação com probióticos e prebióticos tem sido uma das escolhas para manejo das DCVs (ZHU et al., 2020). Os probióticos são microrganismos não patogênicos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, podem proporcionar benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014).

Uma meta-análise demonstrou que os probióticos foram capazes de reduzir significativamente os níveis séricos de CT e LDL-C, sugerindo que esses compostos podem diminuir a morbidade das DCVs (MO; ZHANG; YANG, 2018). Vale ressaltar que um dos critérios para selecionar cepas probióticas consiste na capacidade em promover melhorias no metabolismo do perfil lipídico (BUBNOV et al., 2017).

A capacidade dos probióticos não se restringem à sua ação hipocolesterolêmica, pois também podem interferir no sistema imunológico, provavelmente através da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e parece melhorar estresse oxidativo (WANG et al., 2013; ESSER; PAQUOT; SCHEEN, 2015; JIANG et al., 2016). Nesse sentido, a suplementação de probióticos configura uma intervenção promissora para indivíduos com disfunções metabólicas e DCVs.

Os probióticos compostos por cepas do gênero *Lactobacillus*, renomeado atualmente como *Limosilactobacillus* (ZHENG et al., 2020), são cada vez mais utilizados, diante dos efeitos benéficos observados na saúde do hospedeiro. O *Lactobacillus spp.* pode ser isolado de muitos produtos fermentados, como laticínios e picles (GUO et al., 2013; FENG et al., 2018). Adicionalmente, um estudo demonstrou que subprodutos do processamento de frutas deram origem à *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296, que apresentaram características que configuram cepas probióticas seguras (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a terapia probiótica com *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296, por 8 semanas, conseguiu melhorar o perfil lipídico, reduzir a pressão arterial sistólica, atenuar a via simpática do quimiorreflexo periférico e diminuir o tônus simpático em filhotes de ratos machos e fêmeas de mães alimentadas com uma dieta rica em gordura e colesterol durante a gravidez e lactação (DE OLIVEIRA et al., 2020). Apesar dos achados, não foi demonstrado se essas cepas *L. Fermentum* teriam capacidade de modular processos inflamatórios e de estresse oxidativo. Diante dos achados mencionados, surge a importância de avaliar os possíveis efeitos do *Lactobacillus fermentum* 139, 263 e 296 nos parâmetros metabólicos e inflamatórios, e nos indicadores de estresse oxidativo no eixo intestino-coração de ratos com dislipidemia induzida por dieta rica em gordura e colesterol.

Referencial teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DISLIPIDEMIA E SUAS IMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES

A dislipidemia é definida como uma desordem metabólica caracterizada por uma alteração nos níveis séricos de lipídeos e lipoproteínas, notadamente concentrações séricas elevadas de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e ainda da redução da lipoproteína de alta densidade (HDL-c). De acordo com a Diretriz Brasileira de Dislipidemias (2017), a classificação consiste em quatro tipos: a hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDL-c baixo (FALUDI et al., 2017).

Essa condição clínica pode ter origem genética, denominada dislipidemia primária, ou por fatores externos, conhecida como dislipidemia secundária, causada por diabetes, doenças hepáticas, etilismo, doenças renais, hipotireoidismo e obesidade (CATAPANO et al., 2016; FALUDI et al., 2017). No entanto, apesar dos efeitos prejudiciais causados pelo aumento dos lipídeos, essas moléculas orgânicas desempenham um papel fundamental no organismo (FALUDI et al., 2017).

O colesterol atua como precursor de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D, além disso, é responsável por promover fluidez da membrana plasmática e ativação de enzimas. O colesterol e os ésteres de colesterol são considerados os principais constituintes das lipoproteínas HDL-C e LDL-C, as quais têm como função transportar colesterol e TG do fígado para tecidos periféricos, e desses tecidos para o fígado, respectivamente (NELSON; COX, 2014). Os triglicerídeos são compostos por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol, e tem como uma de suas funções, ser armazenados no tecido adiposo e muscular como fonte de energia, inclusive, esses lipídeos podem fornecer mais energia que aminoácidos e carboidratos (NELSON; COX, 2014).

Portanto, fisiologicamente diversos mecanismos regulam as concentrações de colesterol e suas frações, através da síntese e transporte desse lipídeo (LE ROY et al., 2019). O metabolismo de lipídeos pode ocorrer por duas maneiras: pela via endógena, através da biossíntese no fígado; e a via exógena, que consiste na obtenção de lipídeos a partir da dieta (NELSON; COX, 2014). As gorduras e óleos presentes na dieta são compostos principalmente de triglicerídeos. Após a ingestão desses macronutrientes, os sais biliares liberados no intestino são responsáveis por emulsificar estes lipídeos, formando micelas, que tornam as moléculas de lipídeos mais

acessíveis à ação de lipases no intestino. As lipases por sua vez, hidrolisam os triglicerídeos em estruturas mais simples, como ácidos graxos livres e glicerol.

Após serem absorvidas pelas células intestinais, essas moléculas formam complexos lipoproteicos ricos em triglicerídeos denominados quilomícrons, os quais são levados pelos vasos linfáticos até a circulação via ducto torácico (NELSON; COX, 2014). Na circulação sistêmica, os quilomícrons sofrem ação da lipase lipoproteica (LPL), liberando ácidos graxos, glicerol e colesterol não esterificado destas partículas (NELSON; COX, 2014). Os ácidos graxos por sua vez, são utilizados por células musculares e do tecido adiposo, por outro lado, os quilomícrons remanescentes são metabolizados pelo fígado, para formação de VLDL (NELSON; COX, 2014).

O organismo também é capaz de promover a síntese de lipídeos nos hepatócitos, cujo processo é denominado lipogênese (NELSON; COX, 2014). O fígado é responsável por promover a junção de lipídeos e apoproteínas, levando a formação de VLDL, que são lipoproteínas ricas em triglicerídeos e contém a ApoB100, como principal apolipoproteína (NELSON; COX, 2014). De maneira semelhante ao que ocorre com os quilomícrons, quando liberadas na circulação sistêmica, as VLDL sofrem ação da LPL e liberam ácidos graxos, que são utilizados pelos tecidos (NELSON; COX, 2014). As VLDL catabolizadas, tornam-se um pouco mais densas, formando lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), esta por sua vez, também sofre ação da LPL, e forma lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As LDL são capturadas pelos tecidos ao se ligarem ao seu receptor de LDL (LDLR) (NELSON; COX, 2014). A expressão desses receptores no fígado constitui um dos mecanismos principais responsáveis que determina os níveis de colesterol na circulação, e depende da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima que participa da síntese de colesterol hepático. Os hepatócitos também sintetizam HDL, uma lipoproteína que realiza o transporte de colesterol dos tecidos periféricos de volta para o fígado, fenômeno conhecido por transporte reverso de colesterol (NELSON; COX, 2014). Além disso, a HDL pode contribuir para a proteção dos vasos contra a aterosclerose, como a remoção de LDL oxidado, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio, e a estimulação da liberação de óxido nítrico (NELSON; COX, 2014).

É bem descrito na literatura, que uma disfunção no metabolismo lipídico pode promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (VALLEJO-VAZ et al., 2017), neurodegenerativas (IOANNOU, 2015), e até mesmo cânceres (KUZU; NOORY; ROBERTSON, 2016). A partir disso, muitas pesquisas vêm investigando as implicações de alterações nos hábitos alimentares no desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares e

metabólicos. Foi observado que uma dieta rica em gordura e/ou colesterol pode acarretar em elevação de lipídeos séricos e acúmulo de colesterol e triglicerídeos no fígado, e pode induzir condições como aterosclerose, HAS, acidente vascular encefálico e DM2 (DEWULF et al., 2011; YADAV, et al., 2019).

Sabe-se que as DCVs são a principal causa de morte em todo o mundo (YOO; KIM, 2016). Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que 17,5 milhões de pessoas morreram devido a DCVs em 2012, o que representa 31% de todas as mortes no mundo. Nessa perspectiva, a OMS revelou que essa morbidade permanecerá em liderança, afetando 23 milhões de indivíduos até 2030 (OMS, 2009).

Nos últimos anos, evidências epidemiológicas e clínicas tem demonstrado que existe uma relação direta entre elevação de concentrações séricas de colesterol total e o aparecimento de aterosclerose, doença cardíaca coronariana e outras DCVs (VALLEJO-VAZ et al., 2017). A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, em resposta à disfunção endotelial, afetando principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (FALUDI et al., 2017). Os fatores que podem levar ao desenvolvimento dessa condição clínica incluem a dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo (FALUDI et al., 2017). Nesse sentido, a dislipidemia é considerada o principal fator de risco para desenvolvimento de DCVs, sendo o aumento de LDL, uma característica que está intimamente relacionada com indivíduos que apresentam DCVs (YOO; KIM, 2016).

Estudos demonstraram que a aterosclerose induzida por dislipidemia, foi responsável por 45% dos casos de infarto agudo do miocárdio (IAM) na Europa Ocidental e 35% dos casos de IAM em indivíduos da Europa Central e Oriental (YUSUF et al., 2004). Além disso, os Sul-asiáticos possuem as maiores taxas globais de Doença Arterial Coronariana (DAC) (ENAS et al., 2007), sendo um dos maiores problemas de saúde pública da Índia e em muitos países em desenvolvimento (GAZIANO et al., 2005; GUPTA et al., 2008). Foi relatado pela OMS (2009) que a ocorrência de IAM é três vezes maior em pessoas com dislipidemia, quando comparado com indivíduos que possuem perfis lipídicos normais. Vale ressaltar que uma redução de 1% nos níveis séricos de colesterol total pode acarretar a diminuição de 2-3% de risco para DAC (COSTABILE et al., 2017).

Mediante as consequências promovidas pelo aumento das concentrações lipídicas, surge um grande interesse científico em buscar compreender os mecanismos envolvidos na patogênese desse distúrbio metabólico, além da importância em investigar quais as medidas que podem atenuar os efeitos provocados por essa condição clínica (SHARMA; KURPAD; PURI, 2016).

Atualmente, os indivíduos acometidos com dislipidemias são submetidos a tratamento medicamentoso com inibidores da síntese de colesterol, inibidores da absorção de colesterol e sequestrantes de ácidos biliares, entretanto, muitos medicamentos quando utilizados em longo prazo, podem levar a efeitos colaterais significativos que prejudicam a saúde dos usuários (SHARMA; KURPAD; PURI, 2016; LIU et al., 2019).

É bem descrito na literatura que aspectos externos, como a composição da dieta, em especial, a quantidade de colesterol, apresenta um efeito considerável no perfil lipídico (CAVALCANTE et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020). No entanto, estudos recentes vêm demonstrando que modificações em grupos de bactérias podem estar relacionadas com alterações nos níveis circulantes de colesterol (FU et al., 2015; LE ROY et al., 2019). Um estudo investigou a ação da MI na regulação da homeostase de colesterol através da transferência da MI de humanos para camundongos (LE ROY et al., 2019). Os animais que receberam o transplante fecal de indivíduos dislipidêmicos, passaram a apresentar um aumento significativo de concentrações séricas de colesterol quando comparados aos camundongos inoculados com a MI de doadores normocolesterolêmicos (LE ROY et al., 2019).

Aliado a isso, pesquisadores relataram que a MI recebe grande influência diante da exposição à intervenções dietéticas. Por exemplo, o consumo de uma dieta rica em lipídios pode provocar prejuízos na composição e diversidade da MI (TOMASELLO et al., 2014). Adicionalmente, estudos prévios tem demonstrado que um desequilíbrio na composição e diversidade da MI pode representar um fator de risco para o aparecimento de DCVs, obesidade, dislipidemia e resistência à insulina através da sua capacidade em interferir no metabolismo de lipídeos (MARCHESI et al., 2016; KIM; KEOGH; CLIFTON, 2018; LE ROY et al., 2019).

Sendo assim, destaca-se que a relação dieta-MI-hospedeiro possui uma relevância do ponto de vista clínico, gerando um grande interesse para se investigar como modulações na MI podem contribuir para desvendar mecanismos que originam tais condições clínicas (SONG et al., 2017).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) de humanos e outros mamíferos é composto basicamente pela cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e ânus (KARARLI, 1995). O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo, que são compostos

por quatro camadas, que consistem em: camada serosa (mais externa), muscular, submucosa e a mucosa (interna) (TOMASELLO et al., 2016; HALL, 2017). Além disso, o intestino delgado é constituído por vilosidades em seus enterócitos, que possuem extensões denominadas microvilosidades. Essas estruturas são importantes, pois aumentam a superfície de absorção, que contribuem para digestão e absorção de nutrientes (TOMASELLO et al., 2016; HALL, 2017). Por outro lado, o intestino grosso também possui divisões, que compreende ceco, cólon e reto, e apresenta células denominadas colonócitos, cuja principal função consiste em absorver água (TOMASELLO et al., 2016; HALL, 2017). Outro tipo de células presentes nos intestinos são as caliciformes, que tem como função secretar muco para revestir e proteger o epitélio intestinal (TOMASELLO et al., 2016; HALL, 2017).

Esses órgãos possuem como papel principal a digestão, absorção, de nutrientes e formação das fezes. No entanto, além da grande quantidade de alimentos que percorrem o TGI, este também está exposto a possíveis substâncias que podem ser tóxicas e prejudiciais à saúde. Dessa forma, os mecanismos responsáveis pela proteção do TGI, tornam-se cruciais para homeostase do organismo (BENGMARK, 1998; TOMASELLO et al., 2016).

Sabe-se que o organismo é formado por um conjunto de células e uma infinidade de microrganismos, os quais podem ser encontrados em diversas partes do corpo, como pele, cavidade oral, vias aéreas superiores, e principalmente no TGI (GERRITSEN et al., 2011; SENDER; FUCH; MILO, 2016). Embora a composição da MI seja majoritariamente de bactérias, também são encontrados outros tipos de microrganismos, incluindo vírus, fungos e ainda protozoários e helmintos (IANIRO et al., 2014; BLUM, 2017; CHABÉ; LOKMER; SÉGUREL, 2017).

Na microbiota intestinal podemos encontrar aproximadamente 100 trilhões de bactérias, representando 100 vezes o genoma humano. Além disso, estima-se uma quantidade de 1000 espécies de bactérias, caracterizando uma biodiversidade significativa (SONNENBURG et al., 2016; THURSBY; JUGE, 2017). Em adultos saudáveis, a MI pode variar em quantidade e tipos de gênero e espécies de acordo com sua localização no TGI (SARTOR; MAZMANIAN, 2012). Os microrganismos mais encontrados no estômago são dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Peptostreptococcus* e das espécies *Helicobacter Pylori* e *Candida*. Enquanto no duodeno, jejuno e íleo proximal estão principalmente os gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, e no íleo distal, estão presentes os gêneros *Streptococcus*, *Actinomycinae*, *Corynebacteria* e *Clostridium*. No cólon, estão presentes cerca de 160 a 500 espécies de bactérias distintas, principalmente das espécies *Clostridium* Tipo IV e XIV, do gênero *Bifidobacterium* e da família *Enterobacteriaceae*

(SARTOR; MAZMANIAN, 2012). Em relação aos principais filos, as bactérias intestinais em sua maioria, estão divididas em: Firmicutes (64%), Bacteroidetes (23%), e em menores proporções estão Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia (ECKBURG et al., 2005; HUTTENHOWER et al., 2012).

Um dos fatores associados a composição da MI pode ser observado desde o início da vida. Inicialmente, acreditava-se que a colonização do intestino ocorria após o parto. No entanto, atualmente foi relatado que pode ocorrer transferência durante a gestação, provavelmente através da placenta, cordão umbilical ou líquido amniótico (COSTELLO et al., 2009; AAGAARD et al., 2014; CRESCI; BAWDEN, 2015). O tipo de trabalho de parto também é um aspecto importante, pois no parto normal, o intestino neonatal já pode ser colonizado pela microbiota vaginal ou anal materna, por outro lado, a colonização dos neonatos de cesariana ocorre através da microbiota da pele e ambiente hospitalar (NEUMAN, 2017).

A lactação é considerada um dos determinantes da MI diante da transferência de microrganismos maternos, que juntamente com a transmissão de anticorpos e compostos como oligossacarídeos contribuem para o crescimento e a formação da MI na infância (YU et al., 2012; AKAGAWA et al., 2019). Um achado interessante demonstra que existe diferenças, em longo prazo, na composição da MI de bebês que receberam fórmulas lácteas e aqueles que receberam aleitamento materno exclusivo, uma vez que a composição da MI começa a ser determinada a partir do início da vida (BRAHM; VALDÉS, 2017). Adicionalmente, à medida que a criança vai se desenvolvendo, a introdução de outros alimentos, interação com objetos e pessoas também passam a estimular a biodiversidade microbiana (ZHONG et al., 2019)

Embora todos os fatores mencionados sejam essenciais para a composição da MI, existem aspectos internos e externos que podem modular a MI durante qualquer período da vida (MILANI et al., 2017). Dentre estes fatores estão a genética (GOODRICH et al., 2014), dieta, estilo de vida (CONLON; BIRD, 2014), índice de massa corpórea (IMC) (HARO et al., 2016), sedentarismo (BARTON et al., 2017), etnia (DESCHASAUX et al., 2018), uso de antibióticos (DETHLEFSEN; RELMAN, 2010), e entre outros.

Fisiologicamente, os microrganismos habitam o organismo de maneira simbiótica, e possuem funções essenciais para saúde do hospedeiro. A MI possui inúmeros papéis: manutenção da integridade intestinal através de regeneração celular (NATIVIDAD; VERDU, 2013); constitui uma barreira intestinal; atua no controle da proliferação de bactérias patogênicas presentes no intestino (TRALONGO et al., 2014; TOMASELLO et al., 2014); regulação do sistema imunológico (THURSBY; JUGE, 2017); metabolismo e absorção de nutrientes

(KELDER et al., 2014; ROWLAND et al., 2018); produção de muco (TRALONGO et al., 2014); e fornece vitaminas e enzimas, como vitamina K e biotina (PAREKH; BALART; JOHNSON, 2015). Além disso, a MI é responsável pela fermentação de carboidratos não-digeríveis, levando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são benéficos para o organismo, em contrapartida, a fermentação de aminoácidos leva a formação de metabólitos, como amônia, fenóis e indóis que podem ser prejudiciais à saúde do hospedeiro (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ et al., 2015).

Uma das funções metabólicas mais importantes realizada pela MI consiste na fermentação de carboidratos não digeríveis que ocorre principalmente no cólon através de bactérias anaeróbicas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esse processo dá origem a produção de AGCC, que são considerados fontes de energia tanto para a MI quanto para o hospedeiro (MORRISON; PRESTON, 2016). Os principais metabólitos são acetato, propionato e butirato, que representam 90% dos AGCC produzidos pela MI, entretanto, apesar do acetato ser o AGCC mais encontrado no plasma, essas proporções podem variar de acordo com a dieta (TROMPETTE et al., 2014; DEN BESTEN et al., 2013; MORRISON; PRESTON, 2016).

A composição da MI pode afetar diferentes sistemas, incluindo os sistemas cardiovascular, imunológico, nervoso e metabólico, e por isso, quando ocorre alteração em sua composição com diminuição da biodiversidade, a MI pode ser associada ao desenvolvimento de doenças. Este desequilíbrio na MI denomina-se disbiose, a qual vem sendo comumente relacionada com distúrbios cardiometabólicos (CAVALCANTE et al., 2019; ORTEGA et al., 2020). Dentre os fatores que mais afetam a MI, a dieta tem influência importante na composição bacteriana (WEISS; HENNET, 2017). Em geral, a dieta constitui-se de um conjunto de macronutrientes, que são as proteínas, carboidratos e gorduras, porém, tanto a escassez quanto o excesso de determinado nutriente, podem levar à sérias consequências na MI do hospedeiro (WEISS; HENNET, 2017).

Um aumento na ingestão de HFD gera consequências significativas na MI e maior risco de disbiose intestinal (WEISS; HENNET, 2017). Foi observado que a HFD pode causar aumento do pool de ácidos biliares, assim como, induzir estresse oxidativo na mucosa intestinal, que promove aumento da permeabilidade na barreira epitelial do cólon, que por sua vez acarreta inflamação da mucosa (WEISS; HENNET, 2017; LI et al., 2019).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E SUAS IMPLICAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS E NO ESTRESSE OXIDATIVO

A MI está intimamente relacionada com aspectos metabólicos, fisiológicos, nutricionais e imunológicos, e por isso, alterações nas suas características funcionais e composicionais, podem acarretar grande impacto na saúde do seu hospedeiro (TREMAROLI; BACKHED, 2012; MARTINEZ; LEONE; CHANG, 2017). É bem descrito na literatura que uma HFD causa aumento dos níveis séricos do perfil lipídico associado à inflamação, podendo levar ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como obesidade e dislipidemias. Como mencionado, evidências científicas têm demonstrado que tais doenças estão associadas a disbiose intestinal (CAVALCANTE et al., 2019; ORTEGA et al., 2020)

A exposição da MI à HFD altera colonização, maturação e estabilidade da MI. Essa alteração pode ocorrer rapidamente, como demonstrado em alguns estudos envolvendo animais e humanos (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; DAVID et al., 2014). Um estudo desenvolvido por Carmody et al. (2015) avaliaram os efeitos da exposição de camundongos à dieta com baixo e alto teor de gordura em ciclos de 3 dias. Os resultados apresentaram modificações na comunidade e estrutura da MI, nas quais foram manifestadas em 1 dia de exposição à dieta e revertida após a suplementação com a dieta anterior (CARMODY et al., 2015).

As consequências geradas pela dieta não se aplicam apenas a diversidade e estrutura bacteriana, pois também promove estresse oxidativo, que por sua vez, pode induzir danos em determinados órgãos (SUDHAKARA et al., 2018; DO NASCIMENTO et al. 2020). O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes (VALKO et al., 2016). A exposição a estímulos externos e internos, como, um aumento no consumo HFD, tem sido relacionado com aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da capacidade antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo (YADAV et al., 2019; DO NASCIMENTO et al. 2020). Esse fenômeno vem sendo considerado um dos marcadores mais importantes na etiologia de doenças diante dos efeitos prejudiciais em diversos órgãos, incluindo coração, rim, fígado e pâncreas (TUNAPONG et al., 2018; SUDHAKARA et al., 2018; YADAV et al., 2019). Condições clínicas incluindo, hipertensão, disfunção renal, doenças cardiovasculares e resistência à insulina são associadas ao estresse oxidativo (PIZZINO et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2019; GHOSH; SHCHERBIK, 2020) assim como, a hipercolesterolemia que devido à elevação e acúmulo excessivo de colesterol, torna o organismo mais susceptível à peroxidação lipídica (YADAV et al., 2019).

O estresse oxidativo promove grandes efeitos prejudiciais através da capacidade de atingir componentes celulares, dentre estes, as membranas, organelas, ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), e ainda, afeta as proteínas, lipídeos e lipoproteínas (COLLINS; HORVÁTHOVÁ, 2001; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SHCHERBIK; PESTOV, 2019). Foi relatado que o consumo em excesso de HFD pode aumentar a produção de EROs de formas diferentes, a depender do tecido afetado (YADAV et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2020). No fígado, Matsuzawa-Nagata et al. (2008) demonstraram que HFD pode aumentar a produção de ROS através da oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias.

O TGI representa um sistema, que em caso de alterações da composição bacteriana induzida por HFD, pode tornar-se alvo do estresse oxidativo com graves consequências para o hospedeiro (QIAO et al., 2013). O intestino é um órgão que está constantemente exposto à possíveis agentes tóxicos para o organismo, e foi observado, que camundongos suplementados com HFD apresentaram estresse oxidativo (QIAO et al., 2013). Um dos mecanismos que as EROs acometem o intestino, é através da redução de secreção de muco, que possui um papel fundamental na defesa contra agentes danosos para o organismo (BROWNLEE et al. 2007).

Além disso, algumas EROs podem afetar diretamente as bactérias através da entrada de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio de canais iônicos presentes na membrana (IMLAY, 2008). O estresse oxidativo também é responsável por influenciar a produção de bacteriocinas, que são proteínas e peptídeos tóxicos que podem causar a morte de outras bactérias com grupos relacionados (GHAZARYAN et al., 2014; WEISS; HENNET, 2017). Essa estratégia pode aumentar as alterações na composição bacteriana associada ao desenvolvimento de inflamação (GHAZARYAN et al., 2014). As EROs produzidas a partir da disbiose intestinal induzida por HFD também podem danificar o epitélio intestinal através de peroxidação lipídica, com consequente formação de MDA, podendo causar aumento da permeabilidade da barreira epitelial do intestino e respostas inflamatórias locais ou sistêmicas (LI et al., 2019; CAVALCANTE et al., 2019).

Em condições fisiológicas, a barreira intestinal possui alta eficiência em proteger a mucosa de possíveis agentes tóxicos. Essa proteção ocorre por diversos mecanismos como, camada de muco, fatores antimicrobianos, imunoglobulina A, componentes do sistema imunológico e proteínas que constituem as junções comunicantes (KÖNIG et al., 2016; WELLS et al., 2017). As células do epitélio intestinal se comunicam através de junções comunicantes, nas quais são formadas pelas proteínas claudina-1, ocludina e zonulina-1 (SIRCANA et al., 2019). Como mencionado, a disbiose induzida por HFD pode gerar alterações nessas proteínas

levando à prejuízo da integridade da mucosa intestinal associada ao estresse oxidativo e inflamação (LI et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2020), favorecendo um aumento na permeabilidade da membrana epitelial à translocação de patógenos (TRALONGO et al., 2014).

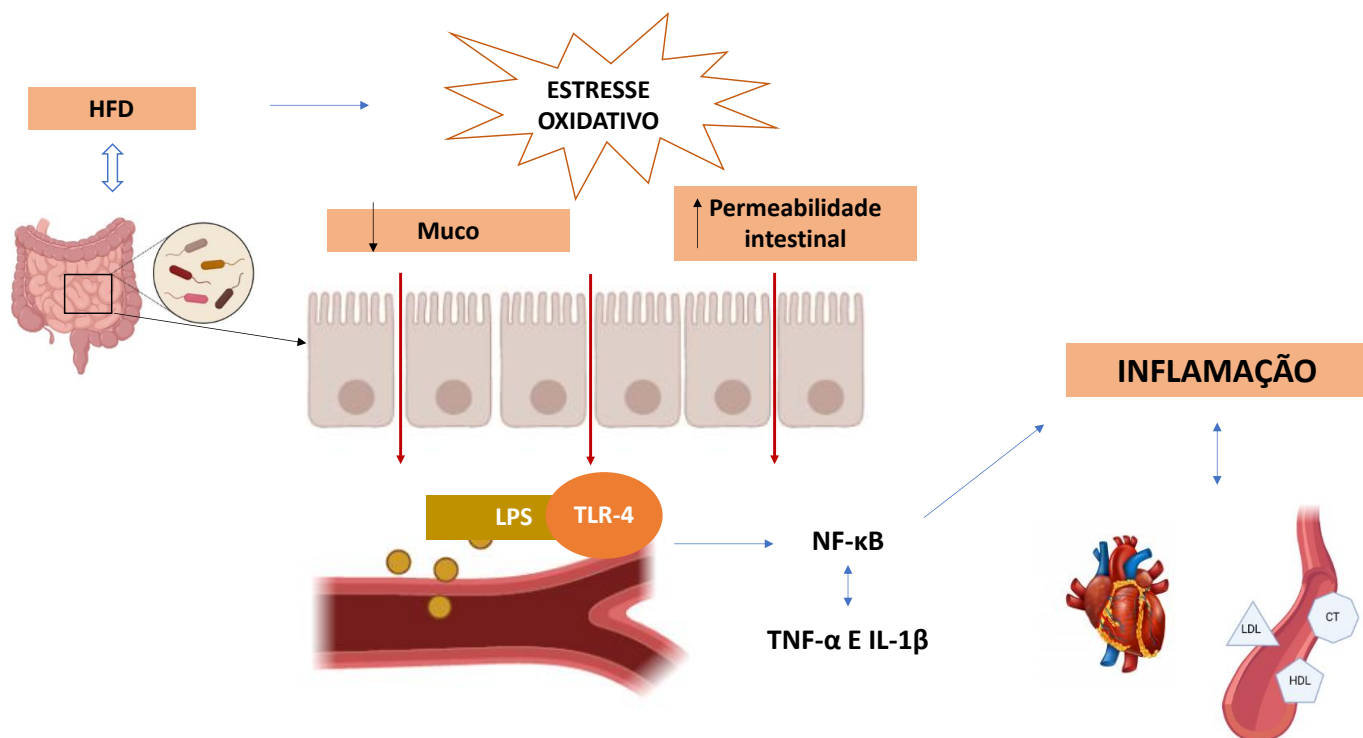
Diante do aumento da permeabilidade intestinal, os componentes oriundos da MI, incluindo ácido lipoteicóico, peptidoglicano, flagelina, DNA bacteriano e LPS podem induzir ativação do sistema imunológico. O LPS configura um dos principais componentes da parede celular externa das bactérias Gram-negativas, sendo considerado um dos fatores da resposta inflamatória, sugerindo uma possível associação entre o LPS intestinal e as doenças cardiometabólicas (CANI et al., 2007; ELSON et al., 2007; PASTORI et al., 2017; YOSHIDA et al., 2018). Estruturalmente, o LPS é dividido em: lipídeo A, o núcleo do oligossacarídeo; e o antígeno O (RAETZ; WHITFIELD, 2002), sendo o lipídeo A, a estrutura responsável por causar endotoxidade. O reconhecimento de uma molécula de LPS pelo receptor Toll-like 4 (TLR4) é mediado pela proteína de ligação a LPS, o co-receptor CD14 de TLR4 e a proteína-2 de diferenciação mieloide (MOREIRA et al., 2012). Após o reconhecimento de LPS, o TLR4 causa uma série de ativação de vias de sinalização que levam ao aumento da produção de fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF- κ B) (GRIMALDI et al., 2009; MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010; CANI; DELZENNE, 2011). A translocação de NF- κ B para o núcleo induz a ativação de genes que podem codificar proteínas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 18 (IL-18) (LU; YEH; OHASHI, 2008; BHARDWAJ et al., 2020).

O TLR4 está presente na superfície da membrana de células imunes (monócitos, macrófagos, células de Kupffer) e outras células (adipócitos, hepatócitos, células endoteliais), e por isso, a entrada do LPS na corrente sanguínea se torna um gatilho para indução de inflamação crônica de baixo grau nos tecidos (MOREIRA et al., 2012; MURPHY; VELAZQUEZ; HERBERT, 2015). O processo de endotoxemia metabólica causada pelo LPS pode ser um marcador importante para indivíduos com doenças crônicas (TSUKUMO et al., 2007; CREELY et al., 2007; MILLER et al., 2009; PUSSINEN et al., 2011).

A inflamação representa umas das características comuns em diversos distúrbios cardiometabólicos, pois aliada ao estresse oxidativo, está envolvida na patogênese dessas condições clínicas (HUSSAIN et al., 2016). Estudos prévios têm demonstrado que a dislipidemia pode ser associada à inflamação, uma vez que um estado dislipidêmico refletiu no aumento de TNF- α e IL-1 β , as quais são citocinas comumente relacionadas com uma resposta pró-inflamatória (ZHOU et al., 2015; JIANG et al., 2016; LIU et al., 2019). Pacientes com diabetes,

obesidade e DCVs apresentaram níveis elevados de LPS circulantes quando comparados à pacientes saudáveis, sugerindo que a endotoxemia metabólica presente nessas doenças, possivelmente está associada à estimulação do LPS na produção excessiva de citocinas inflamatórias pelo sistema imunológico (CREELY et al., 2007; MILLER et al., 2009; PUSSINEN et al., 2011). Nesse sentido, a modulação da MI pode representar uma estratégia terapêutica para manejo de distúrbios relacionados com disbiose intestinal, incluindo, dislipidemias, obesidade e hipertensão arterial (BUBNOV et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2019).

Figura 1. Esquema sobre mecanismos da disbiose induzida por HFD no estresse oxidativo e inflamação



Fonte: Autor, 2021. Possíveis mecanismos entre a disbiose induzida por HFD e o aumento de estresse oxidativo e inflamação. A disbiose induzida por HFD (do inglês High Fat Diet) promove aumento de estresse oxidativo no intestino, promovendo diminuição de muco e aumento da permeabilidade intestinal, tornando o intestino susceptível à entrada de agentes nocivos, como o LPS (lipopolissacarídeo), que é reconhecido principalmente pelo TLR-4 (receptor Toll-like 4). Após o reconhecimento, o TLR4 causa uma série de ativação de vias de sinalização que levam ao aumento da produção de fatores de transcrição, como NF-κB (fator nuclear kappa B). Este por sua vez, se transloca para o núcleo, e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1β (interleucina 1 beta), promovendo aumento da inflamação, que vem sendo associada DCVs e dislipidemia.

2.4 PROBIÓTICOS

Os probióticos são considerados microrganismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas, promovem benefícios para o hospedeiro. Atualmente, a utilização de probióticos vem sendo comumente praticada e encontram-se extensivamente no mercado, diante das propriedades apresentadas pelos probióticos de última geração (HILL et al., 2014).

Os probióticos podem ser consumidos como suplementos ou inseridos em alimentos ou bebidas lácteas ou não lácteas (VIJAYA KUMAR et al., 2015). As cepas probióticas podem causar melhora na saúde do hospedeiro por diferentes maneiras, mas para desempenhar suas funções, os probióticos precisam apresentar algumas características relacionadas à segurança, dentre estas: resistência ao pH gástrico e aspectos do meio intestinal, adesão às células epiteliais do intestino, co-agregação e propriedades de hidrofobicidade, capacidade de antagonizar patógenos, susceptibilidade a antibióticos, além de ausência de genes virulentos e atividade mucinolítica (SAARELA, MOGENSEN et al. 2000; DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

Dentre os microrganismos utilizados como cepas probióticas, podem ser encontrados: os *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius*), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium lactis*), *Bacillus* (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*), *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus salivarius*), *Lactococcus*, *Escherichia* e leveduras, como *Saccharomyces* (PREEDY, 2010; IANNITTI; PALMIERI, 2010; ZHU et al., 2020). No entanto, as bactérias mais comumente utilizadas em formulações probióticas são principalmente membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CHAMPAGNE et al. 2011).

Após serem consumidos, os probióticos parecem se instalar temporariamente no intestino delgado e grosso, e agem alterando o ambiente colônico e nos aspectos fisiológicos, metabólicos e inflamatórios do hospedeiro. Essas ações podem ocorrer de maneiras distintas, podendo ser por meio da regulação direta ou indireta no hospedeiro (ZHU et al., 2020). Nos últimos anos, as pesquisas envolvendo probióticos têm conquistado cada vez mais visibilidade por representar uma ferramenta terapêutica com capacidade de desempenhar efeitos potenciais na saúde do hospedeiro (PAVLOVIĆ; STANKOV; MIKOV, 2012; CAVALCANTE et al., 2019; YADAV et al., 2019). Basicamente, as funções mais conhecidas dos probióticos consistem em alterar a composição da MI, influenciando a produção significativa de bactérias benéficas

(CAVALCANTE et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020); promover reforço da barreira intestinal, aumentando os comprimentos das microvilosidades e formação de muco (RAO; SAMAK, 2013; HSIEH et al., 2015); e influenciar positivamente no sistema imunológico (YADAV et al., 2019).

Na literatura, as vantagens dos probióticos em doenças intestinais e inflamatórias são extensamente conhecidas (KURPAD, 2018). Vários estudos indicaram que os probióticos podem aliviar a intolerância à lactose, reduzir reações inflamatórias ou alérgicas, possuem efeitos anticâncer de cólon, reduzir sintomas de dermatite atópica, diarreia, constipação, candidíase e infecções do trato urinário (MERCENIER; PAVAN, 2003; REID et al., 2003; OUWEHAND, 2007). Também foi relatado os benefícios que os probióticos exibiram na prevenção de infecções respiratórias em crianças, cáries dentárias, úlceras devido ao *Helicobacter pylori*, e encefalopatia hepática (GOLDIN; GORBACH, 2008; WILLIAMS, 2010).

A maioria das bactérias ácido lácticas são reconhecidas como seguras e utilizadas amplamente como cepas probióticas devido aos efeitos potenciais que desempenham na MI (HUANG et al., 2014; KONG et al., 2020). Em especial, os *Lactobacillus* spp. são o principal grupo de bactérias lácticas, que caracterizam-se como Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes e não esporuladas (NAABER; MIKELSAAR, 2004).

O gênero *Lactobacillus* apresenta aproximadamente 261 espécies, nas quais possuem os nomes validados publicamente (ZHENG et al., 2020). De maneira geral, as espécies *Lactobacillus* spp. podem ser encontradas em diversas partes do corpo humano, assim como, de outros animais. Entretanto, algumas são mais abundantes no TGI, incluindo, *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. fermentum* (KONG et al., 2020). Apesar dos alimentos lácteos serem considerados um meio favorável para adquirir probióticos, a prevalência de indivíduos com intolerância à lactose e dislipidemia ressaltam a necessidade de produzir probióticos de origem não láctea (RANADHEERA et al., 2010; PERES et al., 2012). Dentre as mais de 260 espécies de *Lactobacillus* já identificadas, 25 são definidas como LAB frutofílicas por habitarem nichos abundantes em frutose, como flores e frutas (AGRIOPOULOU et al., 2020; GEORGE et al., 2018). Por isso, a formulação de cepas probióticas de origem vegetal pode ser uma estratégia interessante para indústria alimentar (GARCIA et al., 2016).

As frutas são caracterizadas como alimentos ácidos, que reproduzem condições físico-químicas semelhantes ao TGI (NEMATOLLAHI et al., 2016; GARCIA et al., 2016). Essa particularidade é um ponto-chave na seleção de microrganismos, pois o ambiente ácido prejudica a sobrevivência de bactérias possivelmente patogênicas presentes na fruta (SHEEHAN; ROSS;

FITZGERALD, 2007; NAEEM et al., 2012). Por outro lado, a acidez juntamente com a presença de compostos fenólicos favorece a permanência de bactérias com características potenciais para se tornar probiótica, dessa forma, os subprodutos originados do processamento de frutas são capazes de gerar uma ampla variedade de microrganismos, especialmente, *Lactobacillus* (NEMATOLLAHI et al., 2016; GARCIA et al., 2016).

Um estudo avaliou *in vitro* se cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas apresentavam segurança, aplicabilidade fisiológica e propriedades tecnológicas para desempenhar atividades potencialmente probióticas (DE ALBUQUERQUE et al., 2018). Os resultados deste estudo demonstraram que as cepas de *Lactobacillus* investigadas apresentam propriedades como adesão, agregação, coagregação, antagonismo e sobrevivência à exposição a condições gastrointestinais simuladas, e ausência de atividades hemolíticas e mucinolíticas (DE ALBUQUERQUE et al., 2018). Dentre as cepas avaliadas no estudo, as cepas *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 apresentaram o melhor desempenho para a maioria das características avaliadas (DE ALBUQUERQUE et al., 2018). Esse estudo demonstra que essas cepas provenientes do processamento de frutas podem executar atividades probióticas, sendo boas escolhas para estudos pré-clínicos e clínicos, e assim, posteriormente se tornar uma alternativa para fins terapêuticos em humanos (DE ALBUQUERQUE et al., 2018).

A partir disso, foi realizado um estudo investigando os efeitos da suplementação de *L. fermentum* 296 sobre parâmetros cardiometabólicos induzidos por uma HFD em ratos machos. Os resultados demonstraram que a suplementação de *L. fermentum* 296 por 4 semanas aumentou a quantidade de *Lactobacillus spp.* sugerindo que a cepa escolhida pode modular a composição da MI, causando aumento da população de *L. fermentum* 296 no intestino, mesmo em condições de disbiose induzida por dieta hiperlipídica. Além disso, essa cepa probiótica reduziu a atividade simpática e pressão arterial sistólica em ratos suplementados com uma dieta hiperlipídica (CAVALCANTE et al., 2019).

Vale salientar que normalmente os probióticos não apresentam a capacidade de desempenhar igualmente todos seus efeitos positivos (WIEËRS et al., 2020). Por isso, vem sendo demonstrado que uma formulação de múltiplas cepas probióticas pode ser uma alternativa com maior eficiência terapêutica (YOO et al., 2013).

Nesse sentido, foi avaliado os efeitos da administração de uma formulação probiótica composta pela combinação das cepas *L. fermentum*139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum*296 em ratos machos e fêmeas expostos à dieta hiperlipídica materna durante a gravidez e lactação com o intuito de investigar os parâmetros cardiovasculares e metabólicos (DE OLIVEIRA et al.,

2020). Essa intervenção ocorreu por 8 semanas, e conseguiu promover melhora do perfil lipídico e redução dos níveis séricos de MDA, assim como diminuiu a pressão arterial sistólica e média dos filhotes machos (DE OLIVEIRA et al., 2020). A proposta desse estudo também foi interessante para avaliar as respostas sexo-dependente mediante suplementação com probióticos (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Nos últimos anos, as evidências científicas demonstram que as espécies de *Lactobacillus* spp. podem proporcionar benefícios notáveis no equilíbrio da MI (KONG et al., 2020). Esses efeitos foram observados quando a suplementação de diferentes combinações de *L. fermentum* e *L. plantarum* conseguiram modular a funcionalidade e diversidade a MI de camundongos (LINNINGE et al., 2019).

Os benefícios dos probióticos não se limitam aos efeitos positivos na MI, alguns estudos demonstraram que *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. casei* Shirota reduzem os níveis séricos de corticosteróides (LIU et al., 2016; BRAVO et al., 2011; WANG et al., 2016; OHLAND et al., 2013; TAKADA et al., 2016). Além disso, os probióticos *L. helveticus* e *L. fermentum* diminuíram as concentrações do hormônio adrenocorticotrópico (WANG et al., 2016; LIANG et al., 2015).

Um dos parâmetros fundamentais para selecionar cepas probióticas consistem na capacidade de afetar o metabolismo lipídico do hospedeiro, em particular, o colesterol (BUBNOV et al., 2017). Recentemente, estudos in vivo demonstraram que probióticos são capazes de melhorar o perfil lipídico causando diminuição dos níveis séricos de colesterol, sendo os probióticos compostos por *Lactobacillus*, os principais responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico (BUBNOV et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020; DE LIMA GUIMARÃES et al., 2020).

As diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* podem causar outros efeitos positivos no metabolismo do hospedeiro, como modulação da função hepática (PARK et al., 2013) e redução do acúmulo de gordura (LI et al., 2020). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que os probióticos formados por *L. plantarum* e *L. gasseri* contribuíram para diminuição do peso corporal (KANG et al., 2013; WU et al., 2015; AMINLARI et al., 2019). Além disso, de acordo com Linninge et al. (2019), os dados de sequência do gene 16S rRNA, demonstraram que a combinação de duas cepas de *L. fermentum*, GOS47 e GOS1, pode desempenhar um papel importante no aumento da atividade anti-inflamatória da MI (LINNINGE et al., 2019).

O *Lactobacillus* spp. vem apresentando efeitos altamente eficientes na melhora do estresse oxidativo em células e tecidos do organismo, em especial, no TGI (KONG et al., 2020). Por isso, os benefícios atribuídos por meio das cepas probióticas no âmbito metabólico, fisiológico e imunológico parecem ser uma alternativa promissora para manejo de doenças crônicas relacionadas com MI, metabolismo lipídico, estresse oxidativo e inflamação (YOO; KIM, 2016; KONG et al., 2020).

2.5 PROBIÓTICOS E DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS

A elevação do colesterol representa um fator de risco para o desenvolvimento de DCVs, sendo imprescindível a busca por novas estratégias para prevenção e tratamento da hipercolesterolemia (YADAV et al., 2019). Uma meta-análise demonstrou que a suplementação com probióticos pode contribuir na prevenção de hipercolesterolemia primária e atenuar fatores de risco para DCVs (MO; ZHANG; YANG, 2018).

Um estudo realizado por Nido e colaboradores (2016) verificaram que ratos obesos alimentados com dieta rica em colesterol, apresentaram fígados comprometidos, entretanto, após tratamento com *L. acidophilus*, foi observado diminuição nos níveis de colesterol no soro e no fígado (Nido et al., 2016). O *L. acidophilus* ATCC 4356 preveniu o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos ao reduzir as concentrações séricas de colesterol (HUANG et al., 2014). Os probióticos *L. plantarum* CAI6 e *L. plantarum* SC4 também apresentaram um efeito protetor em modelos de doença cardiovascular em camundongos hiperlipidêmicos através da redução de colesterol total e LDL (WANG et al., 2013).

Evidências crescentes têm demonstrado que os benefícios dos probióticos no perfil lipídico podem ser explicados por diferentes maneiras (JONES et al., 2012; HUANG et al., 2014; TIAN et al., 2015; NIDO et al., 2016). Estudos de coorte em várias populações demonstraram que os ácidos biliares podem servir como biomarcadores importantes para avaliar DCVs (JOVANOVIĆ et al., 2018; LI et al., 2020).

O colesterol atua como precursor da síntese de ácidos biliares, os quais são sintetizados no fígado pela via clássica iniciada pelo colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1) (WAHLSTROM et al., 2016). Os ácidos biliares primários são excretados no intestino, e sofrem modificações através das bactérias intestinais formando os ácidos biliares secundários (JONES et al., 2003; RYAN et al., 2015; YOO; KIM, 2016). A enzima denominada hidrolase dos sais biliares (BSH)

catalisa a hidrólise de ácidos biliares primários conjugados com glicina ou taurina e produz ácidos biliares desconjugados, estes por sua vez, são menos reabsorvidos quando não conjugados, o que resulta na excreção de altas quantidades de ácidos biliares livres nas fezes (JONES et al., 2003; RYAN et al., 2015; YOO; KIM, 2016). Aliado a isso, os ácidos biliares desconjugados são menos eficientes em emulsificar os lipídeos no intestino, e consequentemente, provoca redução da absorção de lipídeos (YOO; KIM, 2016).

Curiosamente, a modulação da atividade da BSH pode ser uma estratégia para controle de doenças metabólicas, além de ser um dos mecanismos executados pelas cepas probióticas para reduzir colesterol (TSUKUMO et al., 2007; JONES et al., 2008). Os *Lactobacillus* podem desempenhar atividade de hidrolase ácido biliar, e assim, são capazes de hidrolisar ácidos biliares primários em ácidos biliares livres (BEGLEY et al., 2006; GUO; Li, 2013; WANG et al., 2014). Possivelmente, tais efeitos parecem contribuir para diminuição dos níveis séricos de colesterol tanto pelo aumento da necessidade de colesterol na síntese de novos ácidos biliares, e assim, promover reposição da quantidade perdida pelas fezes, quanto pela redução da emulsificação de gorduras que reflete na diminuição de colesterol absorvido pelo lúmen intestinal (JONES et al., 2003; BEGLEY et al., 2006).

Algumas cepas de *Lactobacillus* podem induzir a ligação de colesterol à superfície celular ou incorporá-lo à parede celular de bactérias, levando a diminuição de colesterol livre do hospedeiro (KIMOTO; OHMOMO; OKAMOTO, 2002). Outro mecanismo exercido pelo *Lactobacillus* consiste na capacidade de produzir colesterol redutase, na qual é responsável por converter o colesterol intracelular e extracelular em coprostanol, que posteriormente é liberado nas fezes (COSTABILE et al., 2017). Além disso, as cepas probióticas com *Lactobacillus* podem produzir ácido ferúlico, conhecido por inibir enzimas como a HMG-CoA, que está relacionada com a síntese de colesterol endógeno (TOMARO-DUCHESNEAU et al., 2014).

A suplementação com probióticos contribuem para aumento da formação de AGCC no intestino, os quais podem reduzir os níveis de colesterol bloqueando a síntese de colesterol hepático e redirecionando o colesterol plasmático para o fígado, este efeito tem sido atribuído principalmente ao propionato (WONG et al., 2006; DILMI-BOURAS, 2006; KUMAR et al., 2012).

Além da dislipidemia, a hipertensão arterial também representa um fator de risco para o desenvolvimento de DCVs, assim como está presente na obesidade, diabetes mellitus e síndrome metabólica (YANG et al., 2015). De acordo com a VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2016) a hipertensão arterial caracteriza-se pelo aumento persistente da pressão arterial (PA) nas

artérias sistêmicas, sendo considerado HAS quando os níveis pressóricos são ≥ 140 e/ou 90 mmHg (SBC, 2016). Apesar dos inúmeros medicamentos anti-hipertensivos, a prevalência de hipertensão permanece alta (YANG et al., 2015).

Aliado ao tratamento farmacológico, a mudança no estilo de vida também caracteriza uma das ferramentas para melhorar o processo fisiopatológico da HAS (SBC, 2016). A suplementação com probióticos tem sido cada vez mais investigada como um possível agente terapêutico para tratamento da HAS (CAVALCANTE et al., 2019; ROMÃO DA SILVA et al., 2020; DE LIMA GUIMARÃES et al., 2020). Um dos mecanismos que as cepas probióticas podem contribuir para melhora da HAS, inclui a produção de peptídeos bioativos (THUSHARA et al., 2016). Durante o processo de fermentação, alguns peptídeos liberados inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA), promovendo redução na síntese de angiotensina II, e por consequência, redução de PA (THUSHARA et al., 2016). Um estudo demonstrou que o consumo de *L. fermentum* CECT5716, ou com uma combinação de *L. coryniformis* CECT5711 e *L. gasseri* CECT5714 por 5 semanas, reduziu a pressão arterial sistólica associado à proteção dos órgão-alvo contra possíveis danos e melhora da disfunção endotelial em modelo espontaneamente hipertenso (GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2015). Tais feitos possivelmente estão relacionados ao aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico devido à diminuição do estresse oxidativo e inflamação vascular (GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2015).

O consumo de probióticos parece desempenhar efeitos positivos em doenças cardiometabólicas, especialmente, através de suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (YADAV et al., 2019; HUANG et al., 2020). Fisiologicamente, os níveis de EROs são baixos dentro das células através da ação de sistemas antioxidantes, que podem ser divididos em sistema enzimático, constituído por enzimas como SOD, CAT e GST, assim como, sistemas não enzimáticos como glutatona (GSH) e flavonóides (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; DO NASCIMENTO et al., 2020). Entretanto, fatores como disbiose induzida por HFD, pode aumentar os níveis de EROs e reduzir a ativação do sistema antioxidante, causando no desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs conhecido por estresse oxidativo (QIAO et al., 2013).

Um estudo investigou os efeitos da suplementação de *L. paracasei* subsp. *Paracasei* M5, *L. paracasei* subsp. *Paracasei* X12 (X12) e *L. coryniformis* subsp. *Torquens* T3 no estresse oxidativo em camundongos obesos expostos à HFD (SONG et al., 2016). O consumo de *L. paracasei* subsp. *paracasei* M5, *L. paracasei* subsp. *paracasei* X12 e *L. coryniformis* subsp. *torquens* T3 atenuou de maneira significativa a redução da GPx (SONG et al., 2016). Em

contrapartida, a suplementação de *L. paracasei* subsp. *Paracasei* M5 e *L. coryniformis* subsp. *torquens* T3 reduziu significativamente os níveis de MDA no fígado (SONG et al., 2016). O MDA caracteriza-se como produto da peroxidação lipídica e representa um biomarcador importante para estresse oxidativo, e esses achados sugerem que essas cepas probióticas apresentaram sucesso em reduzir a peroxidação lipídica no fígado (SONG et al., 2016). O consumo de *L. paracasei* subsp. *paracasei* M5 e *L. coryniformis* subsp. *torquens* T3 conseguiu aumentar a atividade de SOD no fígado desses camundongos, por outro lado, apenas a suplementação com *L. coryniformis* subsp. *torquens* T3 foi capaz de aumentar atividade de CAT no fígado (SONG et al., 2016). Esses resultados indicam que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes no fígado é parcialmente atribuído à elevação de *Lactobacillus* (SONG et al., 2016).

Outro estudo avaliando os efeitos do *Lactobacillus fermentum* MTCC5898 em ratos submetidos à dieta rica em colesterol demonstrou que os níveis elevados de MDA no fígado e nos rins dos animais alimentados com uma dieta rica em colesterol foram reduzidos significativamente após a administração de *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898 (YADAV et al., 2019). Adicionalmente, os autores encontraram um aumento significativo na atividade enzimática da SOD e CAT nos tecidos renal e hepático de ratos que receberam probióticos (YADAV et al., 2019), sugerindo que administração com essa cepa probiótica pode produzir efeitos antioxidantes.

A influência dos probióticos sobre o sistema imunológico pode ocorrer através de metabólitos, componentes da parede celular e DNA, por isso, os efeitos imunomoduladores podem ser provenientes até mesmo de bactérias probióticas mortas ou componentes originados dos probióticos, como partes de peptidoglicano ou DNA (OELSCHLAEGGER, 2010). Esses produtos são reconhecidos pelas células do hospedeiro, particularmente pelas células epiteliais intestinais e células imunes relacionadas ao intestino (OELSCHLAEGGER, 2010). Uma simples comunicação entre probióticos e células epiteliais por meio de adesão pode ativar vias de sinalização que provocam a imunomodulação (OELSCHLAEGGER, 2010).

Nessa perspectiva, outro mecanismo atribuído aos probióticos consiste na capacidade de adesão à mucosa intestinal, que reflete uma condição para a colonização, favorecendo essa modulação do sistema imunológico (GIOACCHINI et al., 2014; NISHIYAMA; SUGIYAMA; MUKAI, 2016). A liberação de fatores solúveis também pode induzir ativação das vias de sinalização em células imunes ou epiteliais do intestino, levando a estimulação das células imunológicas (OELSCHLAEGGER, 2010).

Os probióticos também podem interagir com células epiteliais e muco no intestino. As células caliciformes são responsáveis pela secreção mucina, na qual equivale à um dos principais componentes da mucosa, auxiliando na proteção contra adesão de bactérias patogênicas na mucosa intestinal (COLLADO et al., 2005; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012). A eficácia dos probióticos dependem de alguns fatores como biodiversidade da MI, dieta e interações específicas entre hospedeiro e MI, os quais são características particulares de cada indivíduo (PAVLOVIĆ; STANKOV; MIKOV, 2012).

Caesar e colaboradores (2012) observaram que as cepas probióticas podem reduzir de maneira significativa os níveis de LPS proveniente do intestino (CAESAR et al., 2012), além disso, os probióticos reparam a barreira da mucosa intestinal, modulando a transcrição de genes que codificam as proteínas de junção (ZHU et al., 2020). Diversos mecanismos dos probióticos permanecem desconhecidos, no entanto, já foi observado em estudos que alguns podem produzir bacteriocinas, AGCC e outros fatores com ação antimicrobiana que dificultam o crescimento de patógenos (ZHU et al., 2020). Curiosamente, a capacidade de produzir metabólitos varia entre os probióticos, pois cada cepa probiótica apresenta um perfil metabólico específico (DONOHOE et al., 2012; PEKMEZ; DRAGSTED; BRAHE, 2018). Foi relatado que a cepa de *Lactobacillus* pode produzir ácido láctico e acético, ácidos orgânicos e outros metabólitos com poder antimicrobiano (KURATSU; HAMANO; DAIRI, 2010; SAULNIER et al., 2011).

A suplementação com probióticos pode aumentar a produção de AGCC, que ao serem produzidos, são rapidamente absorvidos pelo epitélio intestinal por transportadores específicos ou difusão, e chegam à corrente sanguínea para atingir seus respectivos alvos, dentre estes, coração, cérebro, músculos e rins, servindo como fonte de energia para tais órgãos (DEN BESTEN et al., 2013; MANRIQUE; GONZÁLEZ, 2017). A partir disso, os AGCC influenciam a fisiologia e metabolismo do seu hospedeiro através de determinadas funções, pois estudos têm demonstrado que os AGCC podem ativar receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e inibir histonas desacetilases (HDAC), podendo refletir na resposta inflamatória (SUN et al., 2017). Os GPCRs ativados pelos AGCC são principalmente GPR41, GPR43 e GPR109, os quais são expressos em praticamente todas as células imunológicas (SUN et al., 2017). Além disso, foi descoberto que o receptor olfatório murino 78 (Olf78), bem como seu ortólogo humano hOR51E2, poderia ser ativado por AGCC, entretanto, esse receptor apresentou resposta apenas quando ativados por acetato e propionato, apesar de ser mais sensível ao propionato (SAITO et al., 2009; PLUZNICK et al., 2013).

O butirato tem sido o AGCC mais relacionado com essas ações anti-inflamatórias, além de ser fonte de energia para os colonócitos, controlar proliferação, diferenciação e apoptose das células, sendo capaz de ter um impacto na ação anti-tumoral, e ainda, fortalecer a barreira intestinal, causando aumento de muco e expressão de proteínas *tight junctions* (TRALONGO et al., 2014). Outros benefícios proporcionados pelo butirato consiste em melhorar sensibilidade à insulina em casos de DM2 (GAO et al., 2009; HENAGAN et al., 2015), além de prevenir obesidade e DCVs induzidos por dieta (LIN et al., 2012; BERNI CANANI; DI COSTANZO; LEONE, 2012). As virtudes desse AGCC também foram observadas na regulação da diferenciação de células epiteliais, melhora da permeabilidade intestinal e da inflamação da mucosa, bem como estimulação de células T reguladoras (CANANI et al., 2011; FURUSAWA et al., 2013). O propionato também é responsável por fornecer energia para os colonócitos e possui efeitos na redução do colesterol (ADAM et al., 2001), e o acetato por sua vez, desempenha um papel importante no crescimento bacteriano, atua no metabolismo do colesterol, e tem sido associado com a regulação do apetite (FROST et al., 2014; PERRY et al., 2016).

Portanto, a identificação de mecanismos associados a mudanças na MI, como alterações bioquímicas, oxidativas e inflamatórias, se torna fundamental para o desenvolvimento de intervenções diretas na prevenção da disbiose. A intervenção por meio da administração de cepas probióticas, pode modular a MI positivamente e configurar uma estratégia promissora para a prevenção e/ou tratamento das doenças causadas por um estado de disbiose intestinal (BUBNOV et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2019).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração oral de uma formulação probiótica contendo *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 nos parâmetros metabólicos, inflamatórios e indicadores de estresse oxidativo em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar em ratos:

- Peso e consumo alimentar;
- Perfil lipídico no soro;
- Ácidos orgânicos, açúcares e oligossacarídeos nas fezes;
- Citocinas inflamatórias séricas;
- Níveis de malondialdeído (MDA) e grupamentos tióis totais e atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos do cólon e coração.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 90 dias de vida. Esses animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno sob temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), com umidade entre 50–55% e ciclo claro – escuro de 12 horas, com livre acesso a água e dieta. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal de Paráíba (protocolo CEUA-UFPB nº 6080240418) e seguiram as orientações do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e os Princípios Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais.

4.2 DIETA

A dieta controle foi preparada de acordo com o American Institute of Nutrition – AIN-93M e a dieta dislipidêmica foi adquirida da Rhoster® Company (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). Quanto a composição dietética, existe a diferença entre ambas nos percentuais calóricos de proteínas (18,7 kcal % HFHC vs. 20,3 kcal % CTL) e carboidratos (51,7 kcal % HFHC vs. 63,8 kcal % CTL), já o nível percentual dos lipídios é elevado apenas na dieta dislipidêmica (29,6 kcal % HFHC vs. 16,1 kcal % CTL). Com relação as fontes lipídicas, a dieta CTL apresenta 4% de óleo de soja, enquanto dislipidêmica é composta de 3% de óleo de soja somado à 6% de gordura animal (banha de porco), 5% de gordura vegetal não-hidrogenada, 0,5% de ácido cólico sigma e 0,5% de colesterol sigma. A composição das dietas CTL e dislipidêmica são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição nutricional dietética (g/100g)

Nutrientes	Dieta Controle	Dieta dislipidêmica
Caseína (85%)*	20	19.86
Amido dextrinizado	13	15.5
Celulose	5	5
Sacarose	10	6
Amido de milho	39.7	33.6
Óleo de soja	7	3
Banha de porco	0	6
Gordura vegetal	0	5

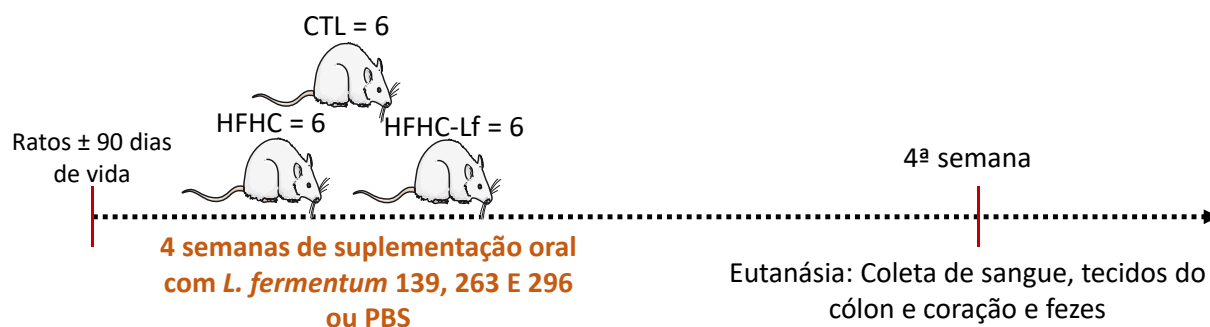
hidrogenada		
Ácido cólico (Sigma)	0	0.5
Colesterol (Sigma)	0	0.5
Colina	0.25	0.25
Metionina	0.3	0.3
Formulação de vitaminas	1	1
Formulação de minerais	3.5	3.5
T-BHQ	0.014	0.014
*A caseína possui 85% de pureza (sendo 85 g de caseína realmente, em cada 100 g).		

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: grupo controle (CTL: n=06) + solução placebo, que recebeu a ração CTL preparada de acordo com AIN-93 M (Reeves; Nielsen, 1993); grupo recebendo uma dieta rica em lipídios e colesterol ou High Fat-High cholesterol (HFHC: n=06) + placebo e o grupo HFHC + formulação probiótica de *L. fermentum* 139, 263 e 296 (HFHC+Lf: n=06) o qual recebeu a dieta associada à intervenção com a formulação probiótica.

Nos grupos CTL e HFHC uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi administrada como placebo por 4 semanas. No grupo HFHC+Lf, uma formulação probiótica contendo cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296 em uma solução de aproximadamente 1×10^9 CFU / mL foi administrada duas vezes ao dia durante 4 semanas. A administração de placebo ou *L. fermentum* foi realizada por gavagem. A ingestão alimentar e o peso corporal foram medidos a cada três dias durante todo o experimento em uma balança apropriada (modelo AS-1000; Marte, Santa Rita MG, Brasil). Após 4 semanas, parâmetros bioquímicos e citocinas foram mensurados no soro, acetato, propionato, frutose e rafinose foram medidos nas fezes e as variáveis de estresse oxidativo foram avaliadas ao longo do eixo intestino-coração.

Figura 2. Resumo do desenho experimental do estudo



Fonte: Autor, 2021. Esquema do desenho experimental realizado no estudo para avaliar os efeitos da suplementação das cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296 sobre os parâmetros metabólicos, marcadores inflamatórios, e estresse oxidativo ao longo do eixo intestino-corção de ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura e colesterol.

4.4 CEPAS PROBIÓTICAS

Foram utilizadas as cepas bacterianas de *L. fermentum* 139, 263 e 296 cedidas pelo Laboratório de Microbiologia, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil). Essas cepas foram previamente identificadas através da análise de sequência do gene 16S rRNA (GARCIA et al., 2016). Os estoques foram armazenados a -20 ° C em meio Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; 20 mL / 100mL).

4.5 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO PROBIÓTICA

Após 24 horas de crescimento em meio MRS (Himedia, Mumbai, Índia) a 37°C, as cepas bacterianas foram centrifugadas (8.000 g/10min/4°C) lavadas duas vezes com solução PBS estéril, ressuspensas em solução PBS e homogeneizadas usando um vortex (30 segundos), para obter suspensões celulares padrão, com leitura a 660 nm (OD660) de 1,0. As suspensões de células mistas com contagens viáveis de aproximadamente 9 log UFC / mL foram obtidas de cada cepa probiótica na proporção de 1: 1: 1 (CAVALCANTE et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020).

4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.6.1 MENSURAÇÃO DE PESO E CONSUMO DIETÉTICO

Foi realizada pesagem dos animais três vezes na semana durante todo o experimento segundo escala adequada (Modelo AS-1000; Marte, Santa Rita, Minas Gerais). E o consumo de ração também foi avaliado três vezes na semana através da pesagem da oferta dietética e do referente rejeito.

4.6.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para obtenção do soro, os animais foram colocados em jejum por seis horas e as amostras de sangue foram obtidas após eutanásia dos ratos. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas à 3500 rpm (rotação por minuto) por 15 minutos. Foram realizadas as dosagens séricas de CT, HDL e TG. Os níveis de colesterol de LDL-c, foram calculados de acordo com Friedewald et al. (1972). Foram utilizados kits comerciais da marca Bioclin, com os reagentes específicos para cada variável bioquímica, seguindo as recomendações do fabricante, e foram realizadas através de espectrofotometria.

Os índices aterogênicos foram calculados da seguinte forma: razão de risco cardíaco (CRR) = Colesterol total / HDL-c (MARTIROSYAN et al., 2007), índice aterogênico do plasma (AIP) = triglicerídeos / HDL-c (DOBIASOVA, 2004) e Índice de Risco II de Castelli (CRI-II) = LDL-c / HDL-c (CASTELLI; ABBOTT; MCNAMARA, 1983).

4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, AÇÚCARES E OLIGOSSACARÍDEOS NAS FEZES

Ácidos orgânicos acético e propiônico, frutose e rafinose foram quantificados por cromatografia líquida (HPLC) usando um sistema LC 1260 Infinity (Agilent Technologies) como descrito anteriormente (BATISTA et al., 2018). Cada amostra foi diluída em água ultrapura filtrada por uma membrana de poro de 0,45 µm, com volume de injeção de 10 µL, vazão de 0,5 mL / min e tempo de execução de 20 min. Os dados obtidos foram processados usando o Open LAB CDS Cessation Edition (Agilent Technologies). Foram realizadas injeções em duplicata e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação (BALL; LLOYD L, 2011).

4.6.4 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) foram determinados usando o kit Millipore 7-plex (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA). Os ensaios foram realizados em uma placa de 96 poços contendo uma membrana de filtro seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas nas amostras foram estimadas a partir de uma curva padrão usando uma equação polinomial de terceira ordem e expressas em pg / mL. As amostras abaixo do limite de detecção do ensaio foram registradas como zero, enquanto as amostras acima do limite superior da quantificação das curvas padrão foram atribuídas ao valor mais alto da curva. A leitura foi realizada em leitor de microplaca.

4.6.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Medição de estresse oxidativo em tecidos do cólon e do coração

Os tecidos do coração e cólon foram homogeneizados em uma solução tampão, contendo TRIS 50mM e EDTA 1mM, pH 7,4, ortogonadato de sódio 1mM e fluoreto de fenilmetanossulfonil 200 μ g / mL usando um homogeneizador digital IKA RW 20, um pilão de potter-Elvehjem e tubos de vidro em gelo. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 1,180g por 10 minutos a 4°C (PEDROZA et al., 2019). Os níveis de proteína foram determinados pelo protocolo de Bradford (1976).

Para avaliação do estresse oxidativo, foi analisado o MDA, um produto da peroxidação lipídica que se caracteriza como um indicador de estresse oxidativo, e foram analisadas enzimas antioxidantes, dentre estas, a CAT, SOD e GST. Além disso, foram quantificados os grupamentos tióis totais.

Foi utilizado 0,5 mg / mL de homogenato do coração e cólon para quantificar a produção de MDA em reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 100 ° C. Resumidamente, adições sequenciais de 30% de ácido tricloroacético e Tris-HCl (3 mM) foram realizadas à amostra, seguido por centrifugação a 2500g por 10 min. Ao sobrenadante resultante, foi adicionado 0,8% (v / v) de TBA, misturado e fervido durante 15 min. Finalmente, após o resfriamento, a reação foi lida a 535 nm em espectrofotômetro.

A atividade enzimática total da SOD foi determinada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1929). As amostras de intestino e coração 0,1 mg/ml foram incubadas com tampão

carbonato de sódio (0,05%, pH 10,2, 0,1 mmol / L de EDTA). Além disso, 30 mM / L de epinefrina (em 0,05% de ácido acético) foram adicionados e a atividade da SOD foi medida pela cinética de inibição da auto-oxidação da epinefrina por 1,5 min a 480 nm [19].

Para medir a atividade da catalase CAT foi determinada pela decomposição de H₂O₂ em O₂ e H₂O. Usamos 0,3 mg / mL de homogenatos de tecido em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e adição de H₂O₂ 0,3 M. Os valores de absorbância foram obtidos através de leitura a 240 nm durante 1 minuto e meio a cada 15s (AEBI, 1984).

Foi utilizado 0,3 mg / mL de homogenatos de tecido para quantificar a atividade da GST, de acordo com Habig et al. (1974). Foi adicionado tampão de fosfato (0,1 M, pH 6,5 contendo 1 mM de EDTA) às amostras, 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 mM de glutathione reduzida (GSH). A absorbância foi medida a 340 nm durante 1,5 min.

Para quantificar grupos de tióis totais, as amostras de homogenatos de tecido (0,3 mg / mL) foram incubadas em tampão de extração (previamente descrito) com 10 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) em um ambiente escuro por 30 minutos. A absorbância da reação foi medida em 412nm (ELLMAN, 1959).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão para testes paramétricos, e mediana (máximo e mínimo) para teste não-paramétricos. Para peso, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Para comparação entre os grupos, foi feito o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade dos dados em parâmetros bioquímicos, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. A maioria das variáveis exigiu o teste paramétrico ANOVA de uma via e o pós-teste de Tukey.

As variáveis que não passaram no teste de normalidade, foi utilizado Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para explorar a relação entre as variáveis bioquímicas e inflamatórias. As correlações obtidas foram classificadas como ruins ($r \leq 0,20$), fracas (0,21–0,40), moderadas (0,41–0,60), boas (0,61–0,80) e excelentes (0,81–1,00). A análise estatística foi realizada por meio do software computacional Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

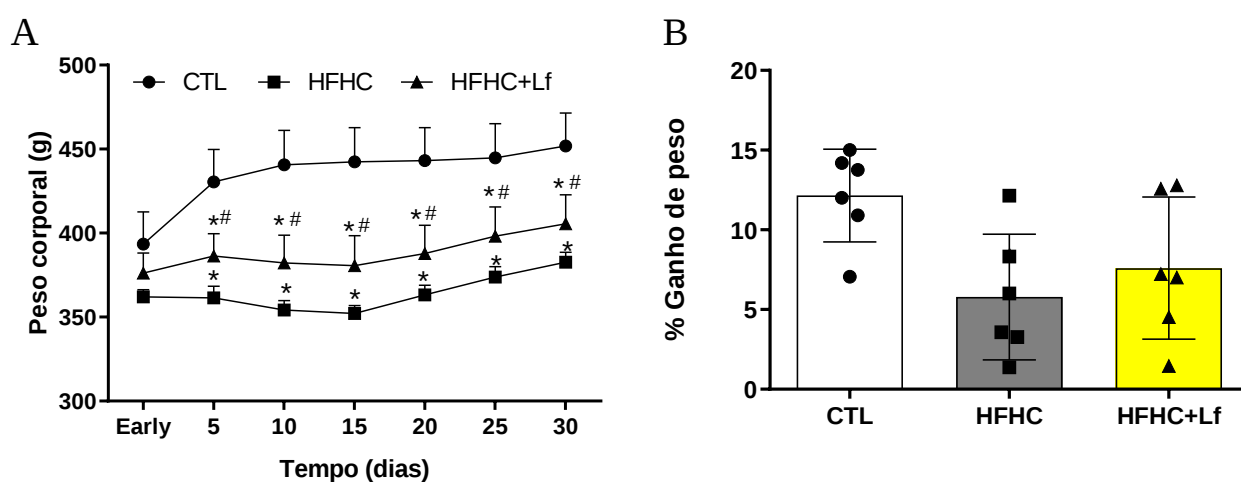
5. RESULTADOS

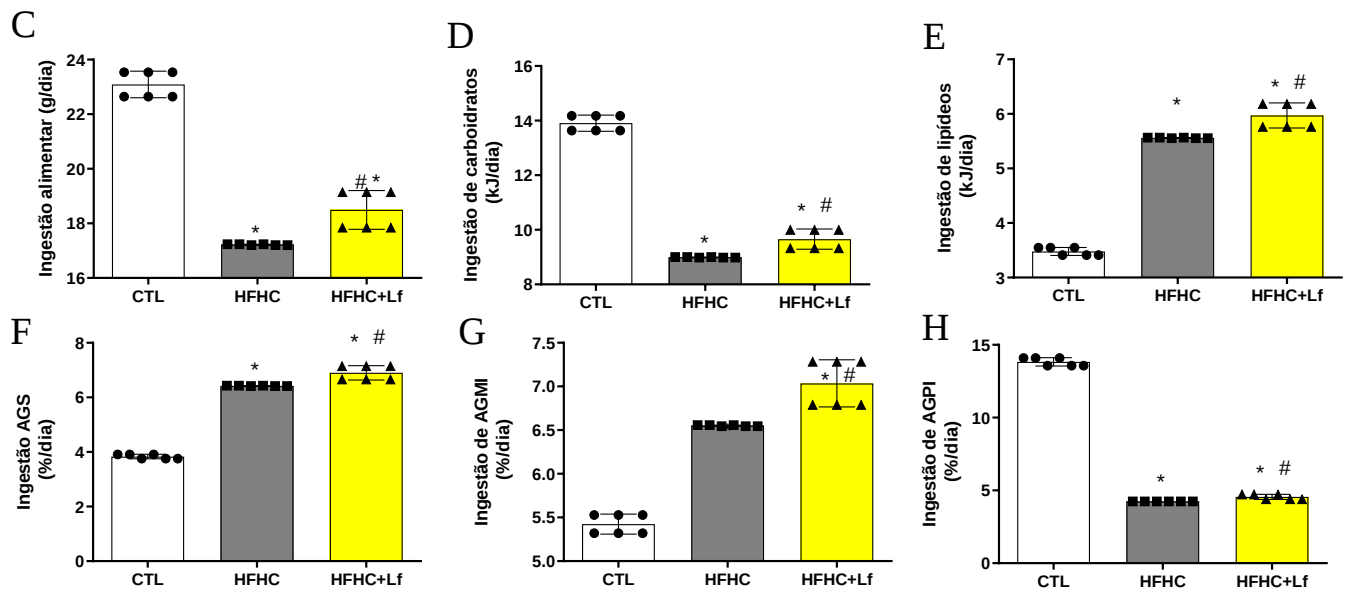
5.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *L. FERMENTUM* 139, 263 E 296 NO PESO CORPORAL E CONSUMO DIETÉTICO DOS ANIMAIS

O peso corporal foi avaliado ao longo dos dias de tratamento nos grupos CTL, HFHC e HFHC+Lf como demonstrado na Figura 3A. Os grupos HFHC e HFHC+Lf apresentaram menor peso corporal quando comparados ao grupo CTL, por outro lado, o peso do grupo tratado (HFHC+Lf) foi maior em relação ao grupo HFHC. Na Figura 3B, observa-se que o percentual de ganho de peso dos animais foi semelhante entre os grupos.

O consumo dietético pelos animais dos grupos CTL, HFHC e HFHC+Lf também foi avaliado como demonstrado na Figura 3C. Foi observado que os grupos HFHC e HFHC+Lf apresentaram um menor consumo em relação ao CTL. Entretanto, o consumo do grupo tratado foi maior em relação ao grupo HFHC (3C). De maneira similar, esses achados também foram demonstrados quando avaliado o consumo de carboidratos (Fig. 3D), lipídeos (Fig. 3E), ácidos graxos saturados (Fig. 3F), ácidos graxos monoinsaturados (Fig. 3G) e ácidos graxos poli-insaturados (Fig. 3H).

Figura 3. Peso corporal e consumo dietético dos grupos CTL, HFHC e HFHC-Lf



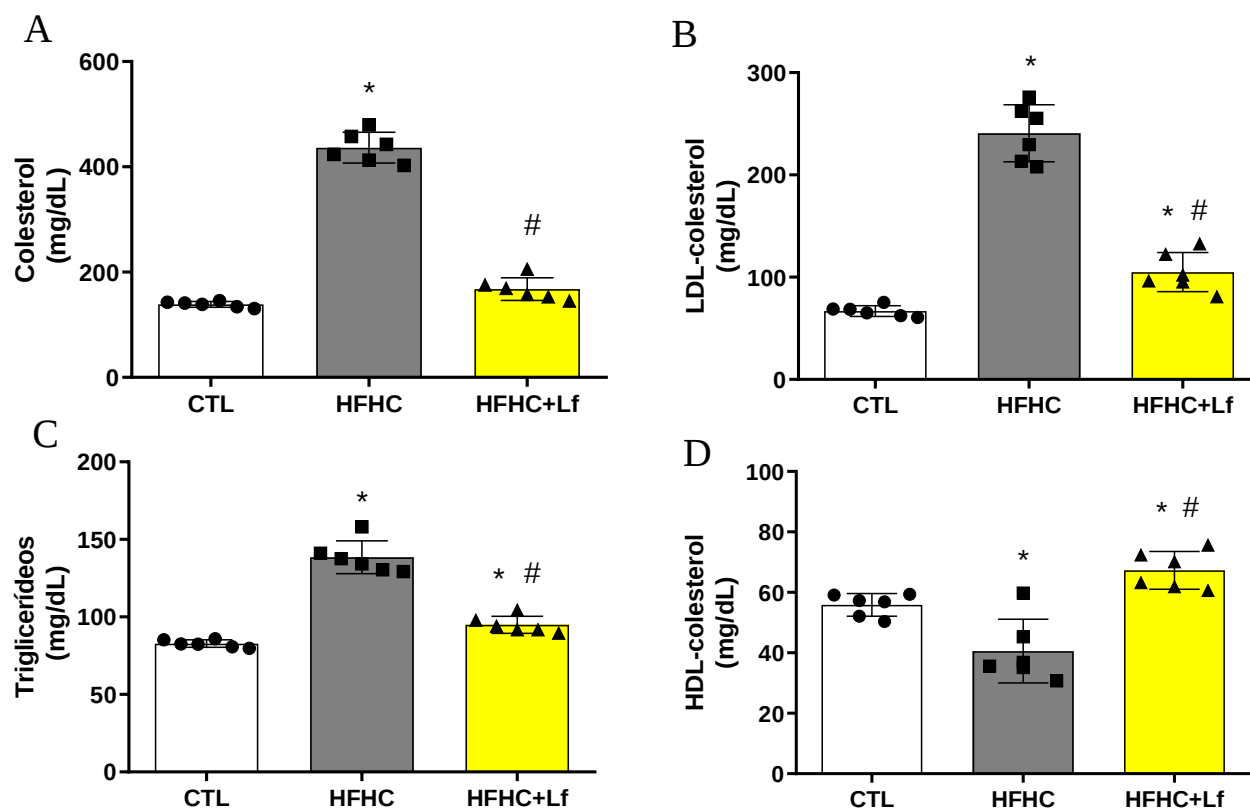


Avaliação do peso corporal (3A), ganho de peso (3B), e consumo dietético (3C), consumo carboidratos (1D), lipídeos (3E), AGS: ácidos graxos saturados (3F), AGMI: ácidos graxos monoinsaturados (3G) e AGPI: ácidos graxos poli-insaturados (3H). Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias $\pm$ DP. Foi utilizado *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni para avaliar peso corporal; e *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey para consumo dietético. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFHC.

5.2 A SUPLEMENTAÇÃO COM *L. FERMENTUM* 139, 263 E 296 MELHOROU PERFIL LIPÍDICO E ÍNDICES ATEROGÊNICOS DE RATOS DISLIPIDÊMICOS

O protocolo experimental baseado na alta ingestão de gordura foi capaz de desenvolver dislipidemia nos ratos (Fig. 4). O grupo HFHC apresentou níveis séricos maiores significativamente de CT (36.1 ± 1.4 vs. 113.5 ± 7.6 mmol/L, $p < 0.0001$), LDL (17.4 ± 1.4 vs. 62.5 ± 7.3 mmol/L, $p < 0.0001$), e TG (0.9 ± 0.03 vs. 1.6 ± 0.12 , $p < 0.0001$) (Fig. 4A – 4C), e menores concentrações séricas de HDL (14.5 ± 1.0 vs. 10.6 ± 2.7 mmol/L, $p < 0.0001$) quando comparado ao grupo CTL. Em contrapartida, o tratamento de 4 semanas com *L. fermentum* 139, 263 e 296 conseguiu prevenir de maneira significativa o aumento nos níveis séricos de CT (43.6 ± 5.6 vs. 113.5 ± 7.6 mmol/L, $p < 0.0001$), LDL (27.3 ± 5.0 vs. 62.5 ± 7.3 mmol/L, $p < 0.0001$) e TG (1.1 ± 0.06 vs. 1.6 ± 0.12 mmol/L, $p < 0.0001$) (Fig. 4A – 4C), e promoveu maiores concentrações de HDL (17.5 ± 1.6 vs. 10.6 ± 2.7 mmol/L, $p < 0.0001$, Fig. 4D).

Figura 4. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 no perfil lipídico de ratos dislipidêmicos.



Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 no perfil lipídico de ratos dislipidêmicos. Níveis séricos de colesterol (4A), LDL-c (4B), HDL-c (4C), TG (4D). Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias $\pm$ DP. Foi utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa (p < 0,05) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa (p < 0,05) em comparação com o grupo HFHC.

Na Tabela 2 também pode ser observado os índices aterogênicos dos grupos CTL, HFHC e HFHC-Lf. O grupo HFHC apresentou valores maiores significativamente de CRR, AIP e CRI-II quando comparado ao grupo CTL. Porém, a suplementação probiótica foi eficaz em atenuar os efeitos causados pela dieta rica em gordura, indicando que o tratamento com *L. fermentum* 139, 263 e 296 pode reduzir os riscos de aterogenicidade.

Tabela 2. Índices aterogênicos dos grupos CTL, HFHC e HFHC-LF

	CTL (n=6)	HFHC (n=6)	HFHC-Lf (n=6)	F / K	p-value
Índices aterogênicos					
CRR	2.5 ± 0.2	11.3 ± 2.9 [*]	2.5 ± 0.5 [#]	53.11	<0.0001
AIP	1.5 ± 0.1	3.5 ± 0.7 [*]	1.4 ± 0.2 [#]	54.86	<0.0001
CRI-II	1.2 ± 0.2	6.2 ± 1.5 [*]	1.6 ± 0.3 [#]	63.93	<0.0001

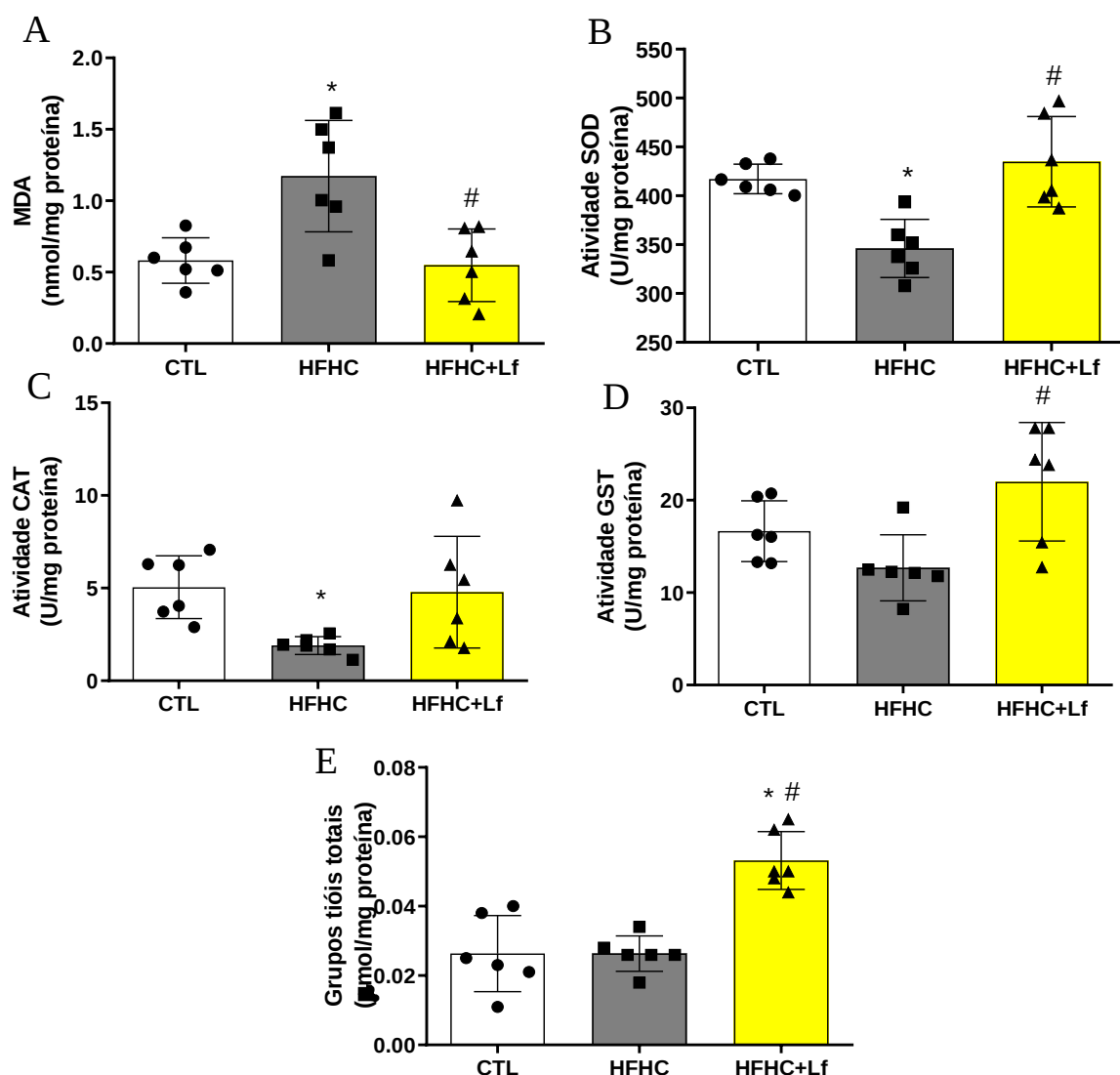
Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 nos índices aterogênicos de ratos dislipidêmicos. CRR: razão de risco cardíaco; AIP: índice aterogênico do plasma; CRI-II: índice de risco II de Castelli. Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias ± DP. Foi utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa (p <0,05) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa (p <0,05) em comparação com o grupo HFHC.

5.3 A SUPLEMENTAÇÃO COM *L. FERMENTUM* 139, 263 E 296 MELHOROU ESTRESSE OXIDATIVO DE TECIDOS DO CÓLON DE RATOS DISLIPIDÊMICOS

A alta ingestão de gordura por 4 semanas promoveu estresse oxidativo no cólon, como demonstrado na Figura 5. Os níveis de MDA foram maiores significativamente no grupo HFHC (1.2 ± 0.4 vs. 0.6 ± 0.1 nmol/mg protein, p<0.05) quando comparado ao grupo CTL (Fig. 5A). Porém, a suplementação probiótica foi capaz de atenuar o aumento dos níveis de MDA (0.5 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.4 nmol/mg protein, p<0.05) induzidos pela dieta, como observado no grupo HFHC-Lf (Fig. 5A).

A atividade das enzimas antioxidantes e os grupamentos tióis totais no cólon também foi avaliada entre os grupos. Na Figura 5B e 5C, observa-se que o grupo HFHC apresentou uma menor atividade das enzimas SOD (346.2 ± 29.8 vs. 417.2 ± 15.1 U/mg protein, p<0.05) e CAT (1.9 ± 0.5 vs. 5.0 ± 1.7 U/mg protein, p<0.05) quando comparado ao grupo CTL, entretanto, o grupo HFHC-Lf apresentou maior atividade da SOD (435 ± 46 vs. 346.2 ± 29.8 U/mg protein, p<0.05) em comparação ao grupo HFHC. Também foi demonstrado que a suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 promoveu maior atividade de GST (22.0 ± 6.4 vs. 12.7 ± 3.6 U/mg protein, p<0.05) quando comparado ao grupo HFHC (Fig. 5D), e as concentrações de grupamentos tióis totais foram maiores significativamente em relação aos grupos CTL e HFHC (Fig. 5E).

Figura 5. Efeitos da suplementação de *L. fermentum* 139, 263 e 296 no estresse oxidativo do cólon de ratos dislipidêmicos



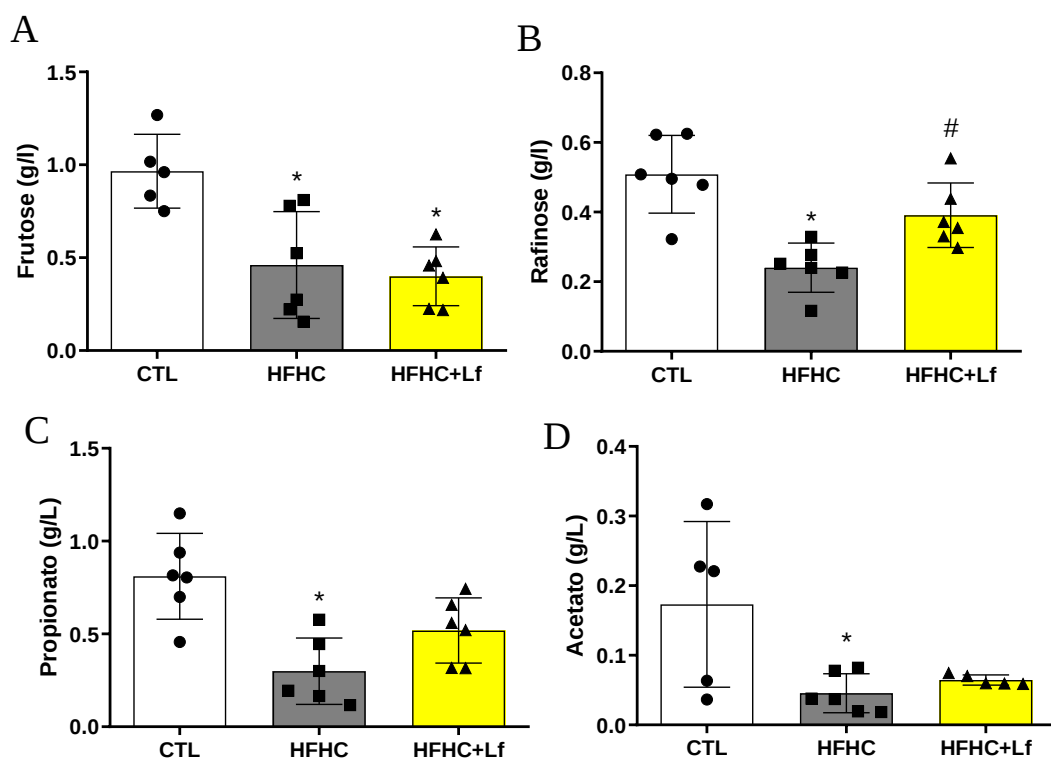
Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 no estresse oxidativo em tecidos do cólon. MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase. Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias ± DP. Foi utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFHC.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE FRUTOSE, RAFINOSE E AGCC NAS FEZES DOS GRUPOS CTL, HFHC E HFHC-Lf

Como demonstrado na figura 6A, os grupos HFHC e HFHC-Lf apresentaram menor quantidade de frutose fecal (0.46 ± 0.28 vs. 0.96 ± 0.19 g/l, $p < 0.05$) quando comparados ao grupo CTL. Na Fig. 6B, o grupo HFHC apresentou menor quantidade de rafinose (0.28 ± 0.12 vs. 0.51 ± 0.11 g/l, $p < 0.05$) nas fezes quando comparado com o grupo CTL.

Além disso, a quantificação de AGCC também foi avaliada nas fezes dos animais (Fig. 6C e Fig. 6D). O consumo de dieta rica em gordura reduziu as concentrações de acetato (0.05 ± 0.02 vs. 0.17 ± 0.11 g/l, $p < 0.05$) e propionato (0.30 ± 0.17 vs. 0.81 ± 0.23 g/l, $p < 0.05$) quando comparado ao grupo CTL. Não foram observadas alterações significativas nas concentrações de AGCC nas fezes do grupo HFHC-Lf.

Figura 6. Conteúdo de frutose, rafinose e AGCC nas fezes

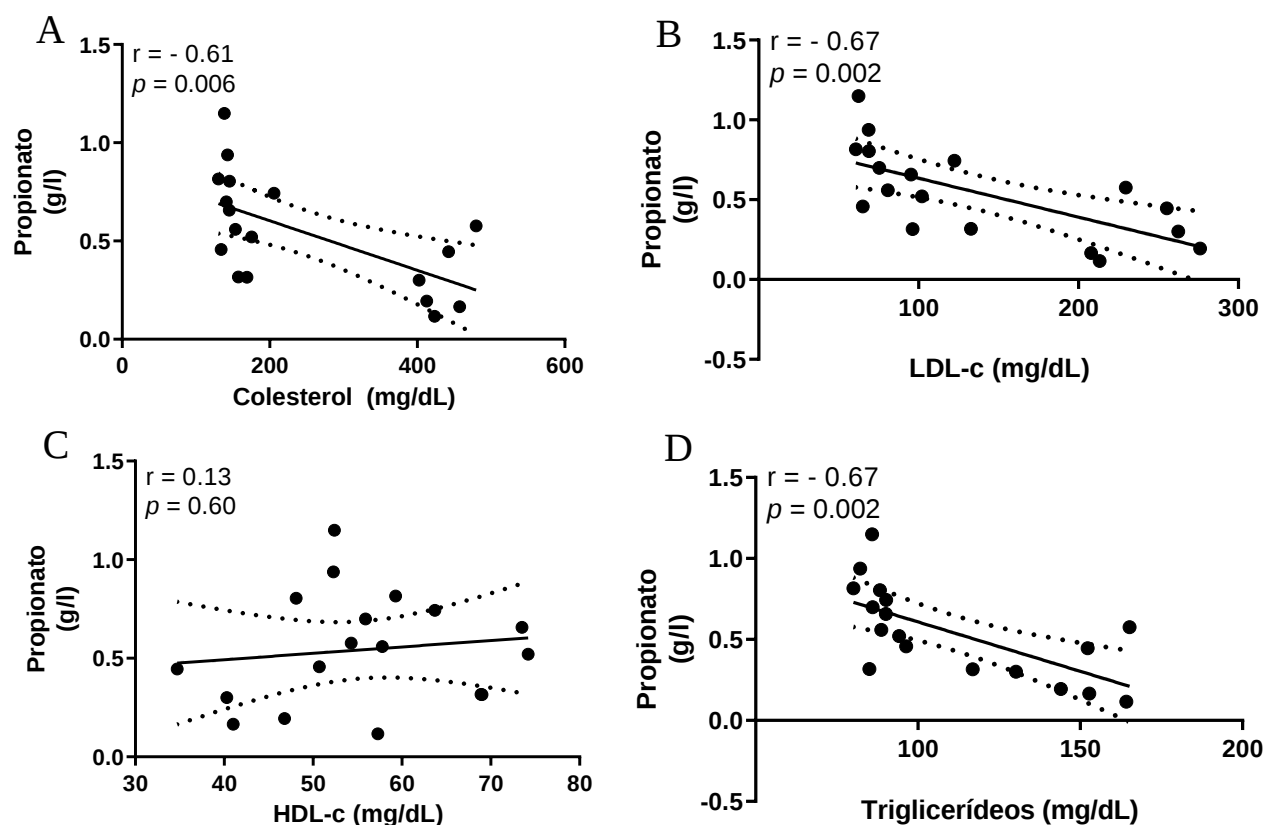


Quantificação de frutose, rafinose, propionato e acetato nas fezes dos grupos CTL, HFHC e HFHC-Lf. Valores são expressos em médias $\pm$ DP. Foi utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFHC.

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE PROPIONATO E MARCADORES DE DISLIPIDEMIA

Para observar se o metabolismo a nível intestinal pode estar envolvido com perfil bioquímico sistêmico foi realizada uma correlação entre o perfil lipídico sérico e as concentrações de propionato, como demonstrado na Fig. 7. A correlação demonstra que um aumento dos níveis séricos de CT (Fig. 7A) ($r=-0.61$, $p=0.006$), LDL (Fig. 7B) ($r=-0.67$, $p=0.002$) e TG ($r=-0.67$, $p=0.002$) foi correlacionado negativamente com as concentrações de propionato, já quando avaliado a correlação entre os níveis de HDL ($r=0.13$, $p=0.60$) e propionato não foi encontrada correlação (Fig. 7A-7D).

Figura 7. Correlação entre propionato e perfil lipídico

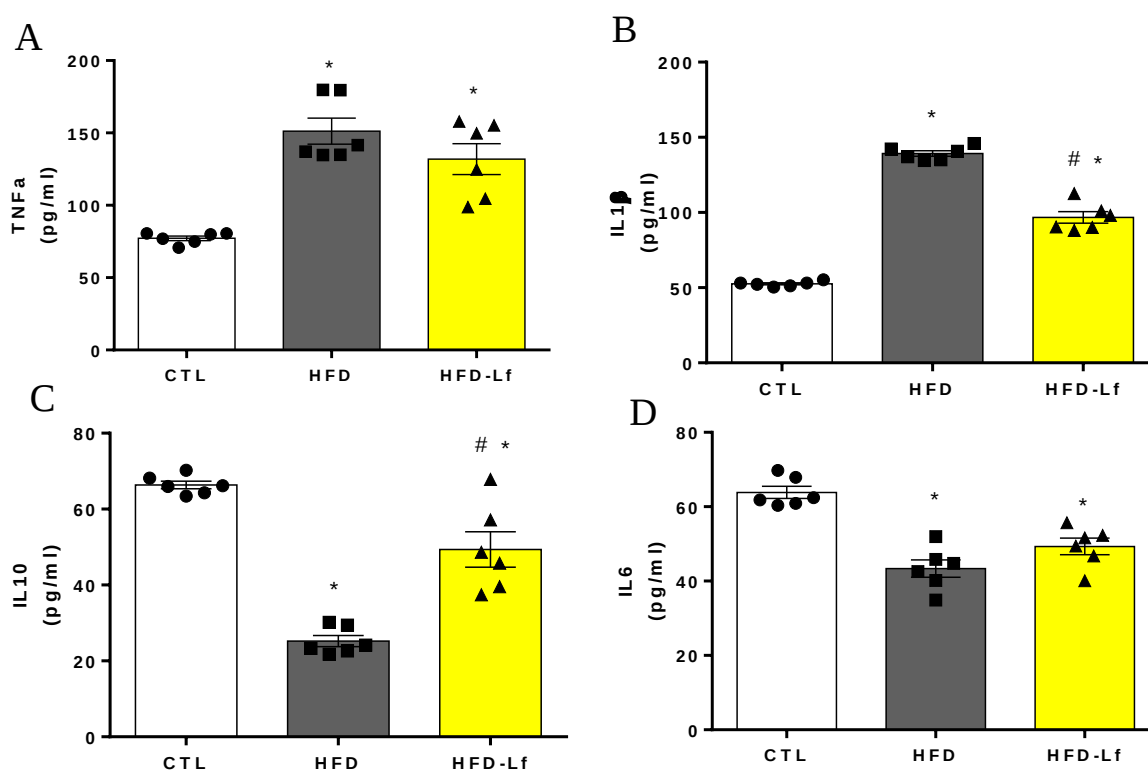


Análise de correlação entre perfil lipídico e propionato. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r). As correlações obtidas foram classificadas como ruins ($r \leq 0,20$), fracas ($0,21-0,40$), moderadas ($0,41-0,60$), boas ($0,61-0,80$) e excelentes ($0,81-1,00$).

5.6 A SUPLEMENTAÇÃO COM *L. FERMENTUM* 139, 263 E 296 MELHOROU INFLAMAÇÃO DE BAIXO GRAU DE RATOS DISLIPIDÊMICOS

Os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem ser observados na Figura 8. O consumo de dieta rica em gordura foi capaz de provocar níveis séricos maiores de TNF- α (78.4 [70.7 - 80.6] vs. 139.3 [134.8 - 179.7] pg/mL, $p>0.05$) e IL-1 β (52.6 $\pm$ 1.7 vs. 139.3 $\pm$ 4.4 pg/mL, $p<0.0001$) (Fig. 8A e 8B), e menores concentrações séricas de IL-6 (63.8 $\pm$ 3.9 vs. 43.3 $\pm$ 5.8 pg/mL, $p<0.0001$, Fig. 8D) e IL-10 (66.4 $\pm$ 2.5 vs. 25.2 $\pm$ 3.6 pg/mL, $p<0.0001$, Fig. 8C) quando comparado ao grupo CTL. Entretanto, o grupo tratado com a formulação de *L. fermentum* preveniu o aumento dos níveis de IL-1 β (96.7 $\pm$ 9.2 vs. 139.3 $\pm$ 4.4 pg/mL, $p<0.0001$) de maneira significativa e promoveu níveis séricos maiores significativamente de IL-10 (49.4 $\pm$ 11.4 vs. 25.2 $\pm$ 3.6 pg/mL, $p<0.0001$).

Figura 8. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 E 296 em marcados inflamatórios no soro dos animais



Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 nas citocinas inflamatórias séricas. Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias $\pm$ DP. Foi

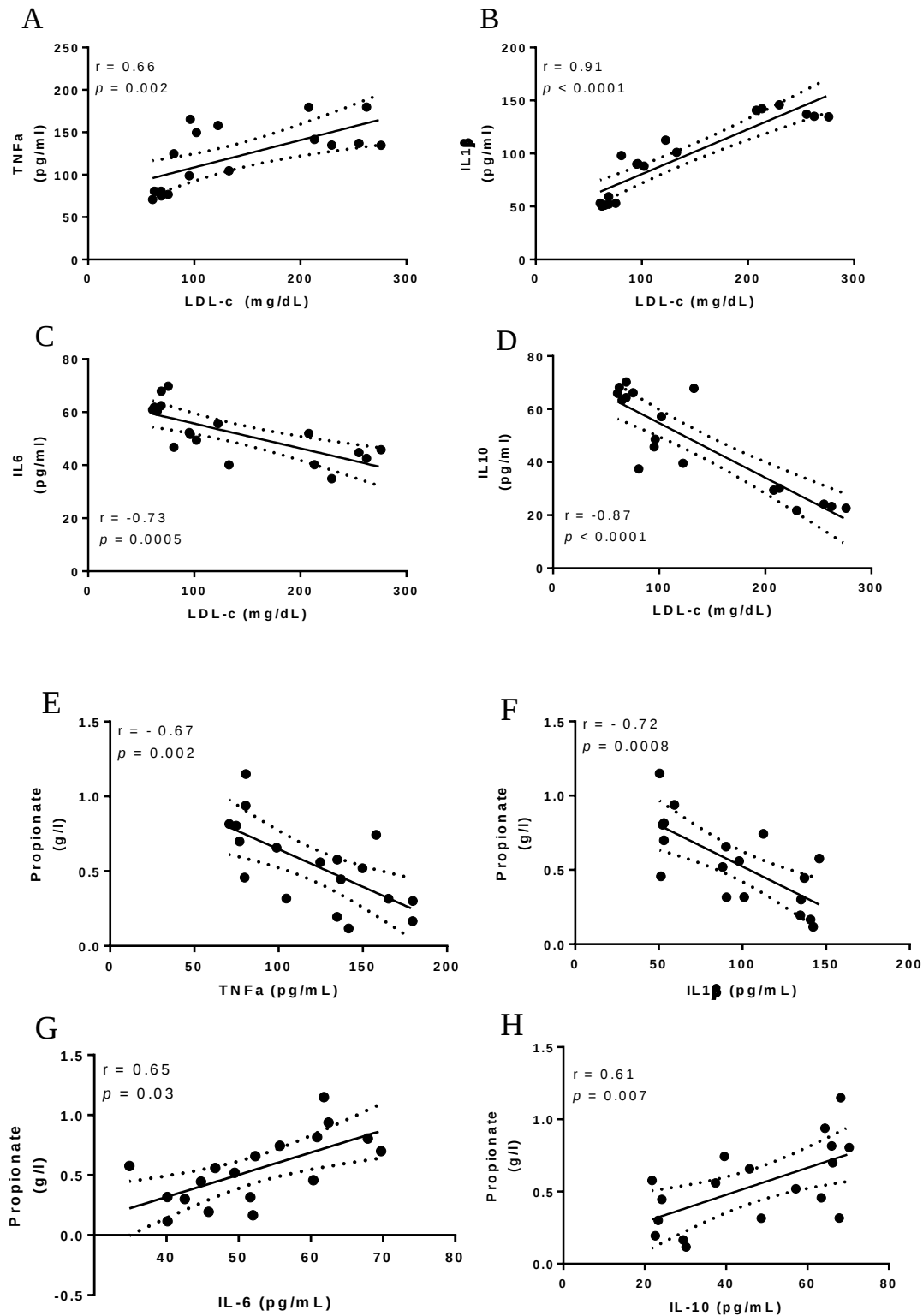
utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFHC.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E CONCENTRAÇÃO DE LDL-C E ENTRE PROPIONATO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Na Figura 9, observa-se a correlação entre os níveis de citocinas inflamatórias e concentração de LDL-C nos grupos CTL, HFHC e HFHC-Lf. Na correlação entre os níveis de TNF- α e LDL-C ($r=0.66$, $p=0.002$, Fig. 9A), observa-se que quanto maior os níveis de LDL-C, maior será as concentrações dos níveis de TNF- α . De maneira análoga, na Fig. 9B, observa-se que a o aumento nos níveis de LDL-C está positivamente relacionado com aumento nas concentrações de IL-1 β ($r=0.91$, $p<0.0001$, Fig. 9B). Por outro lado, quando observado a correlação entre os níveis de IL-10 e IL-6 com as concentrações de LDL-C, encontra-se que quanto maior os níveis de LDL-C, menor são os níveis de IL-10 ($r=-0.87$, $p<0.0001$, Fig. 9C) e IL-6 ($r=-0.73$, $p=0.0005$, Fig. 9D).

Além disso, com o intuito de avaliar se os níveis de propionato pode ser relacionado com marcadores inflamatórios, foi realizada uma correlação entre esses parâmetros. A correlação entre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e concentrações de propionato demonstrou que quanto maior os níveis de TNF- α ($r=0.66$, $p=0.002$, Fig. 9E) e IL-1 β ($r=0.91$, $p<0.0001$, Fig. 9F), menor a concentração de propionato. Por outro lado, a correlação entre o propionato com as citocinas anti-inflamatórias, demonstra que o aumento de IL-6 ($r=-0.73$, $p=0.0005$, Fig. 9G) e IL-10 ($r=-0.87$, $p<0.0001$, Fig. 9H) são diretamente relacionados com aumento das concentrações de propionato.

Figura 9. Correlação entre citocinas inflamatórias e níveis de LDL-c e entre propionato e citocinas inflamatórias

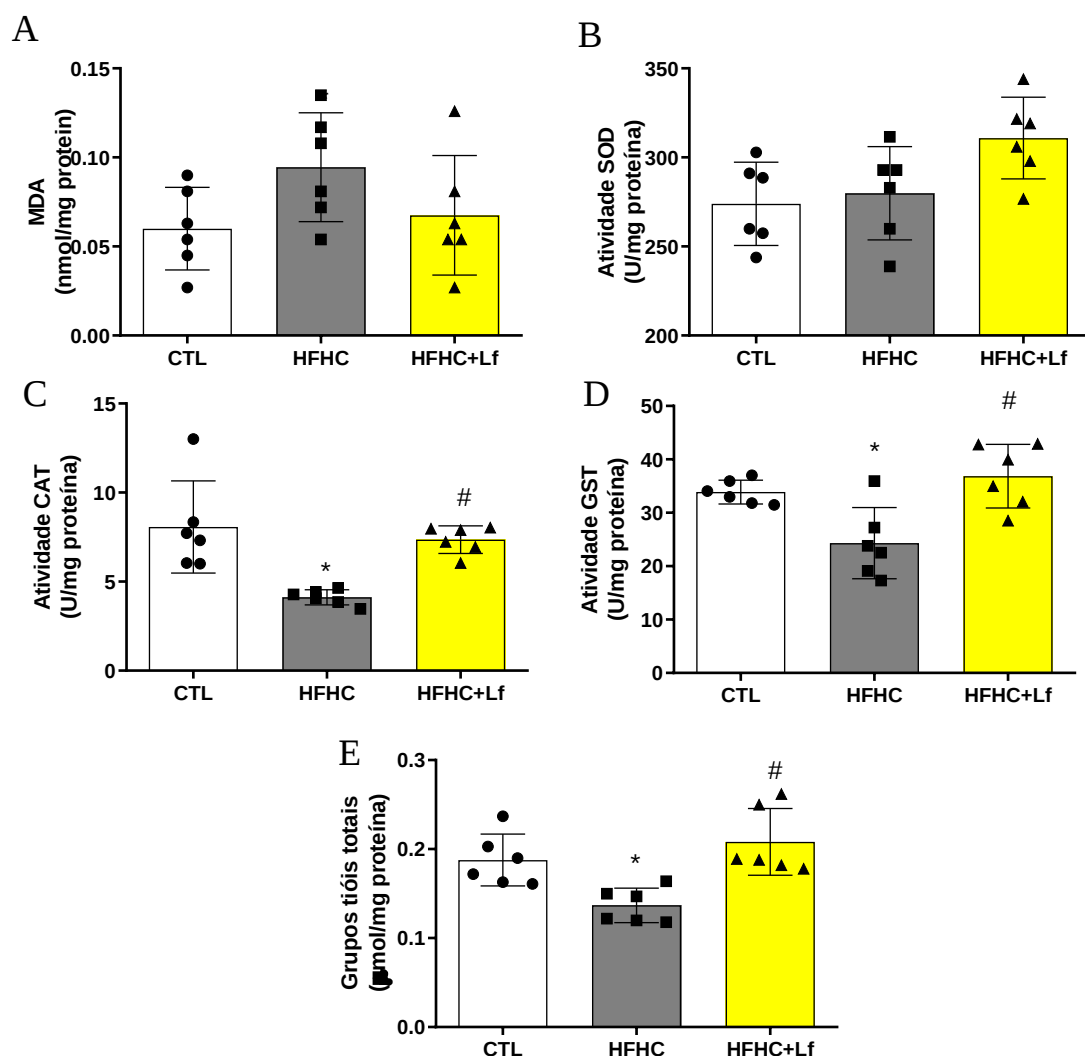


Análise de correlação entre concentrações de LDL-c e citocinas inflamatórias. E análise de correlação entre citocinas inflamatórias e propionato. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r). As correlações obtidas foram classificadas como ruins ($r \leq 0,20$), fracas ($0,21-0,40$), moderadas ($0,41-0,60$), boas ($0,61-0,80$) e excelentes ($0,81-1,00$).

5.8 A SUPLEMENTAÇÃO COM *L. FERMENTUM* 139, 263 E 296 FOI EFICAZ NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM TECIDOS DO CORAÇÃO DE RATOS DISLIPIDÊMICOS

Os dados referentes aos parâmetros de estresse oxidativo em tecidos do coração encontram-se na figura 10. Em relação aos níveis de MDA e SOD, não foram encontradas alterações significativas entre os grupos (Fig. 10A, Fig. 10B), entretanto, o consumo de dieta rica em gordura provocou menor atividade das enzimas antioxidantes, CAT (4.1 ± 0.4 vs. 8.1 ± 2.5 U/mg protein, $p < 0.05$), GST (24.3 ± 6.7 vs. 33.9 ± 2.2 U/mg protein, $p < 0.05$) quando comparado ao grupo CTL (Fig. 10C, Fig. 10D). O grupo HFHC também apresentou menor quantidade de grupamentos tióis totais (0.13 ± 0.02 vs. 0.19 ± 0.03 mmol/mg protein, $p < 0.05$, Fig. 10E). A suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 conseguiu promover maior atividade de SOD (7.3 ± 0.8 vs. 4.1 ± 0.4 U/mg protein, $p < 0.05$) e GST (36.9 ± 5.9 vs. 24.3 ± 6.7 U/mg protein, $p < 0.05$), quando comparado ao grupo HFHC. A concentração de grupamentos tióis totais foi superior no grupo HFHC-Lf em relação aos grupos CTL e HFHC (0.21 ± 0.04 vs. 0.13 ± 0.02 mmol/mg protein, $p < 0.05$).

Figura 10. Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 em parâmetros oxidativos em tecidos do coração



Efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 na atividade de enzimas antioxidantes em tecidos do coração de ratos dislipidêmicos. MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; GST: glutathione S-transferase. Grupos CTL (n=6), HFHC (n=6) e HFHC-Lf (n=6). Valores são expressos em médias $\pm$ DP. Foi utilizado one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com CTL. (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo HFHC.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 na modulação de parâmetros metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo de ratos dislipidêmicos. Nossos resultados demonstraram que a suplementação oral com *L. fermentum* 139, 263 e 296 durante 4 semanas conseguiu melhorar o perfil lipídico, ao promover menores níveis séricos de CT e LDL e maiores concentrações de HDL. Além disso, nossos resultados fornecem evidências pela primeira vez sobre os efeitos do *L. fermentum* 139, 263 e 296 na melhora de estresse oxidativo no eixo intestino-corção e modulação de marcadores inflamatórios séricos de ratos expostos à dieta rica em gordura e colesterol.

Embora o consumo de uma dieta com alto teor de gordura e colesterol geralmente promova aumento de peso corporal, nesse estudo foi verificado que os grupos, HFHC e HFHC+Lf, apresentaram um menor peso quando comparado ao grupo CTL. Entretanto, o grupo HFHC+Lf apresentou maior peso corporal quando comparado ao HFHC. Foi observado anteriormente em um estudo desenvolvido em nosso laboratório, que a ingestão em excesso de HFD por 4 semanas produziu redução da contagem fecal de *Lactobacillus spp.* sem necessariamente promover obesidade, sugerindo que mesmo que o peso corporal não seja modificado, a dieta promove consequências na composição da MI (CAVALCANTE et al., 2019). Além disso, um dos motivos do grupo HFHC apresentar menor peso corporal, pode ser consequência da redução de ingestão alimentar, como foi observado no presente estudo.

O consumo da dieta rica em gordura e colesterol reduziu o consumo de alimentos nos grupos HFHC e HFHC+Lf, que apresentaram menor ingestão alimentar quando comparado com o CTL. Em condições fisiológicas, a exposição à uma dieta rica em gordura promove redução da ingestão de alimentos e retardo do esvaziamento gástrico, provavelmente devido aos efeitos de hormônios intestinais, incluindo colecistocinina (CCK), peptídeo YY (PYY) e peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (LITTLE; FEINLE-BISSET, 2011). Esses resultados também foram observados em outros estudos utilizando dieta dislipidêmica, sugerindo que o efeito sacietogênico causado pelo maior teor de gordura dessa dieta, pode ser relacionado com o menor peso corporal do grupo HFHC (CAVALCANTE et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019).

O protocolo experimental induzido por dieta rica em gordura e colesterol utilizado nesse estudo promoveu o desenvolvimento da dislipidemia caracterizado por maiores níveis de CT, LDL e TG. A suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 promoveu concentrações séricas menores de CT e LDL e maiores níveis de HDL, indicando que essas cepas probióticas são

capazes de modular o perfil lipídico de ratos dislipidêmicos. Em outros estudos foi observado que as cepas probióticas de *L. fermentum* demonstraram exercer efeitos hipocolesterolêmicos em modelos animais, como por exemplo, *L. fermentum* FTDC 8312, *L. fermentum* MJM60397 e *L. fermentum* MTCC: 5898 (YADAV et al., 2019; PALANIYANDI et al., 2019) e em humanos, como *L. fermentum* ME- 3 (KULLISAAR et al., 2016).

É interessante destacar que um estudo avaliou os efeitos apenas de *L. fermentum* 296 em distúrbios cardiometabólicos induzidos por HFD em ratos, demonstrou que a suplementação probiótica não causou aumento nos níveis séricos de HDL (CAVALCANTE et al., 2019), por outro lado, a intervenção com *L. fermentum* 139, 263 e 296 conseguiu aumentar os níveis séricos de HDL-c em filhotes de ratos machos e fêmeas de mães alimentadas com uma dieta rica em gordura e colesterol durante a gravidez e lactação (OLIVEIRA et al., 2020). Esses achados indicam que os probióticos de múltiplas cepas podem ser mais eficazes quando comparado à uma formulação com apenas uma cepa probiótica, podendo sugerir que a combinação de cepas podem ter efeitos complementares no metabolismo do hospedeiro (YOO et al., 2013).

Como mencionado na literatura, os probióticos podem ter efeitos hipocolesterolêmicos através de mecanismos como, metabolismo dos ácidos biliares através da capacidade de modular atividade da hidrolase de sais biliares que foi comumente encontrada em muitas cepas de *Lactobacillus* (BEGLEY et al., 2006; GUO; LI, 2013; WANG et al., 2014); conversão de colesterol em coprostanol por cepas de *Lactobacillus* que produzem colesterol redutase (COSTABILE et al., 2017); assim como os efeitos desempenhados por AGCC, em especial, do propionato que pode inibir a absorção de lipídeos intestinais (WONG et al., 2006; DILMI-BOURAS, 2006; KUMAR et al., 2012), e do butirato que parece reduzir a produção de colesterol hepático (KUMAR et al., 2012; SONG et al., 2017).

Os indicadores aterogênicos são considerados parâmetros relacionados com aumento de lipídeos séricos associados à aterosclerose e outras DCVs (YADAV et al., 2019). No presente estudo, foi demonstrado que o grupo HFHC apresentou maior proporção de CRR, AIP e CRI-II, entretanto, a intervenção com a formulação probiótica conseguiu prevenir o aumento desses indicadores, demonstrando mais um benefício do *L. fermentum* 139, 263 e 296 em contribuir para a diminuição do risco de aparecimento de DCVs. Esses achados também foram encontrados em outro estudo, que investigou os efeitos do *L. fermentum* MTCC: 5898 em ratos alimentados com dieta rica em colesterol (YADAV et al., 2019).

Um dos focos do presente estudo foi investigar se a dieta rica em gordura e colesterol pode promover estresse oxidativo no cólon dos animais, pois a elevação de colesterol pode

resultar em aumento da peroxidação lipídica (YADAV et al., 2019). Dessa forma, demonstramos que a alta ingestão de gordura por 4 semanas promoveu estresse oxidativo no cólon, demonstrado através maiores níveis de MDA e menor atividade de enzimas antioxidantes.

O intestino representa uma barreira, que está constantemente exposta à possíveis danos promovidos por estresse oxidativo (QIAO et al., 2012). Os prejuízos causados pelo MDA afetam a estrutura de membranas, promovendo alterações na permeabilidade, e assim, tornando um alvo de uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas (CHEN; YU, 1994). Estudos demonstraram que uma dieta rica em gordura e colesterol induziu estresse oxidativo de maneira significativa em órgãos relacionados com o metabolismo lipídico, como pâncreas, fígado e intestino (SUDHAKARA et al., 2018; YADAV et al., 2019; DO NASCIMENTO et al. 2020). Adicionalmente, observamos que a dieta rica em gordura e colesterol promoveu redução de componentes do sistema antioxidante no cólon, por diminuir consideravelmente a atividade das enzimas SOD e CAT quando comparado ao grupo CTL. Esses resultados também foram observados em outros órgãos em estudos anteriores, que investigaram os efeitos da dieta rica em gordura e/ou colesterol no estresse oxidativo (YADAV et al., 2019; DO NASCIMENTO et al. 2020). Portanto, maiores concentrações de MDA e menor atividade de enzimas antioxidantes e grupamentos tióis totais refletem os impactos da dieta no estresse oxidativo intestinal.

O método de quantificação de MDA tem sido usualmente realizado para investigar os efeitos de probióticos no estresse oxidativo, tanto no soro, quanto em tecidos, como fígado e cólon (SUN et al., 2013; HUANG et al., 2020). Corroborando com esses estudos, nossa pesquisa demonstrou que a suplementação probiótica contendo *L. fermentum* 139, 263 e 296 foi capaz de promover menores níveis de MDA induzidos pela dieta. A busca por cepas probióticas que possuem mecanismos de ação antioxidante tem sido cada vez mais explorada. Foi demonstrado que os *Lactobacillus* parecem produzir atividades de SOD e CAT, podendo atuar no estresse oxidativo e inflamação da mucosa colônica (TOMUSIAK-PLEBANE et al., 2018).

A partir disso, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 apresentou efeitos positivos no sistema antioxidante do cólon de ratos dislipidêmicos, através do aumento da atividade de SOD e GST, além da maior quantificação de grupamentos tióis totais. Portanto, tais resultados demonstram que essas cepas probióticas possuem grandes propriedades antioxidantes, por conseguir atenuar o aumento de MDA, e ainda prevenir a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, que pode ser prejudicada pela dieta hiperlipídica. Essa capacidade de exercer efeitos antioxidantes já foi observada anteriormente em cepas probióticas de *L. fermentum*, como *L. fermentum* MTCC: 5898 e *L. fermentum* DALI02, que demonstraram melhorar estresse oxidativo por meio de

redução de MDA e aumento da atividade de enzimas antioxidantes no rim, fígado, tecido adiposo e soro de ratos expostos à dieta rica em gordura e colesterol (YADAV et al., 2019; HUANG et al., 2020).

O presente estudo também avaliou o conteúdo de AGCC, frutose e rafinose nas fezes dos animais. Foi demonstrado que a dieta rica em gordura e colesterol acarretou menores concentrações de rafinose fecal. Entretanto, a suplementação com nossa formulação probiótica conseguiu promover maiores concentrações de rafinose. A rafinose é uma fibra dietética solúvel presente naturalmente em vegetais (MAO et al., 2018). Foi demonstrado por HOU e colaboradores (2021) que a rafinose pode promover diretamente o crescimento de *Lactobacillus reuteri*, indicando que essa fibra dietética pode atuar como prebiótico por estimular o crescimento de *Lactobacillus*, levando a uma série de resultados gastrointestinais positivos, incluindo redução da inflamação (ROBERFROID et al., 2010). Portanto, acreditamos que o aumento de rafinose no grupo suplementado pode ser reflexo do metabolismo das cepas no intestino.

O consumo de dieta rica em gordura e colesterol reduziu o conteúdo de acetato e propionato fecal quando comparado ao grupo CTL, apresentando resultados semelhantes a outro estudo que demonstrou que conteúdo de AGCC fecal (principalmente acetato, propionato e butirato) diminuiu significativamente no grupo suplementado com alta ingestão de gordura em comparação com o controle (SONG et al., 2017). Apesar da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296, não apresentar efeitos nos níveis de AGCC fecal, a análise de correlação entre propionato e perfil lipídico, demonstrou que o aumento de propionato, pode estar diretamente relacionado com a diminuição de CT, LDL e TG. Esse achado também foi encontrado com a correlação entre propionato e citocinas inflamatórias, em que demonstramos que o aumento de propionato está correlacionado com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , e aumento das citocinas IL-10 e IL-6.

A relação entre os AGCC e o metabolismo lipídico já vem sendo descrita na literatura. Uma vez que a suplementação com probióticos contribuem para aumento da formação de AGCC no intestino, foi demonstrado que o propionato, em especial, pode reduzir os níveis de colesterol bloqueando a síntese de colesterol hepático através da inibição da HMG-CoA, causando o redirecionamento do colesterol plasmático para o fígado (WONG et al., 2006; DILMI-BOURAS, 2006; KUMAR et al., 2012; ZHUANG et al., 2012). Além disso, estudos têm mostrado que cepas probióticas podem reduzir a quantidade de LDL oxidado, que é um dos agentes potencializadores de MDA (KULLISAAR et al., 2016). Outro efeito dos AGCC consiste na

regulação das respostas imunológicas. A atividade anti-inflamatória do propionato e butirato pode ocorrer através da capacidade desses AGCC em inibir as histonas desacetilases causando alterações no padrão de expressão de várias citocinas (SUN et al., 2017).

Acredita-se que o estresse oxidativo induzido pelo consumo de dietas ocidentalizada e ricas em gorduras, pode influenciar no aumento de inflamação, que por sua vez, promove um mecanismo de feedback positivo, por aumentar ainda mais a produção de EROs, com consequente danos nos tecidos afetados (AGUS et al., 2016; LI et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2020). No presente estudo foi demonstrado que o estresse oxidativo no cólon induzido por dieta rica em gordura e colesterol promoveu inflamação sistêmica de baixo grau, verificado através dos níveis séricos maiores de TNF- α e IL-1 β e menores concentrações séricas de IL-10 e IL-6. Em nossos resultados, verificamos que os níveis de IL-6 foram menores nos grupos HFHC e HFHC-Lf quando comparado ao grupo CTL, indicando que desempenhou atividades anti-inflamatórias, porém, as ações dessa citocina continuam sendo intrigantes, por muitas vezes apresentar ações pró e/ou anti-inflamatórias (EDER et al., 2009; SCHELLER et al., 2011).

O papel das citocinas inflamatórias na hipercolesterolemia e suas complicações foi demonstrado em alguns estudos (ZHOU et al., 2015; JIANG et al., 2016; LIU et al., 2019). Em concordância com esse achado, no presente estudo, a análise de correlação demonstrou claramente que os níveis de LDL estão diretamente correlacionados com a resposta inflamatória. Além disso, os prejuízos promovidos pelo estresse oxidativo induzido por HFD, pode causar diminuição das proteínas de junção da barreira intestinal, acarretando aumento da permeabilidade da membrana (LI et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2020) que torna o intestino propenso à entrada de agentes nocivos, como LPS para a circulação sistêmica (TRALONGO et al., 2014). A endotoxemia metabólica promovida pelo LPS vem sendo constantemente relacionada com doenças crônicas (CREELY et al., 2007; MILLER et al., 2009; PUSSINEN et al., 2011), provavelmente via ativação do NF- κ B, que é um fator de transcrição regulado por TNF- α e IL-1 (LU; YEH; OHASHI, 2008; BHARDWAJ et al., 2020).

Diante desses achados, evidências recentes investigaram os efeitos da suplementação probiótica na resposta inflamatória. A intervenção com *L. fermentum* 139, 263 e 296 preveniu o aumento dos níveis de IL-1 β , e apresentou maiores níveis séricos de IL-10. Outros estudos também observaram os efeitos de *Lactobacillus* em marcadores inflamatórios, que apresentaram resultados semelhantes aos do nosso estudo. A administração de *L. plantarum* ATCC 14917 reduziu os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β em camundongos ApoE - / - (HASSAN et al., 2020), assim como, o *L. fermentum* MTCC: 5898 e *L. fermentum* DALI02 que reduziram os níveis de

TNF- α no fígado e tecido adiposo em ratos expostos à dieta rica em gordura e colesterol (YADAV et al., 2019; HUANG et al., 2020).

O aumento de IL-10 promovido pela suplementação de *L. fermentum* 139, 263 e 296, confere um benefício importante a nível intestinal e sistêmico. A IL-10 é conhecida como uma citocina anti-inflamatória, que desempenha funções na homeostase intestinal, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios (MAYNARD et al., 2007; MALOY; POWRIE, 2011). Foi observado em outro estudo que a suplementação de *L. fermentum* CECT5716 (LC40) pode modular o sistema imunológico humano, aumentando as células T regulatórias (Treg) (ARRIBAS et al., 2009; PEREZ-CANO; DONG; YAQOOB, 2010). Essas células produzem IL-10, que inibe a atividade da NADPH oxidase, principal fonte de EROs na vasculatura, resultando em melhora da função endotelial (KASSAN et al., 2011). Aliado a isso, foi observado que probióticos compostos por *Lactobacillus* podem reduzir NF- κ B e consequentemente, diminuir inflamação e estresse oxidativo (BHARDWAJ et al., 2020).

A inflamação sistêmica e um nível elevado de estresse oxidativo são conhecidos por estarem associados à disfunção autonômica cardíaca (CAMPESE SHAOHUA; HUIQUIN, 2005). Além disso, evidências crescentes vem demonstrando possíveis associações envolvendo o “eixo intestino-corção”, sugerindo uma relação entre a MI e o coração (KAMO et al., 2017; NAGATOMO; TANG, 2015). Portanto, investigamos os efeitos da dieta rica em gordura e colesterol e da suplementação probiótica em tecidos do coração. Em relação aos níveis de MDA, não foram apresentadas alterações significativas entre os grupos, entretanto, curiosamente, provocou menor atividade de enzimas antioxidantes, CAT e GST, assim como menor quantificação de grupamentos tióis totais. Já foi demonstrado anteriormente que ratos alimentados com uma HFD apresentaram níveis mais elevados de estresse oxidativo tanto no soro quanto nos tecidos cardíacos (TUNAPONG et al., 2018).

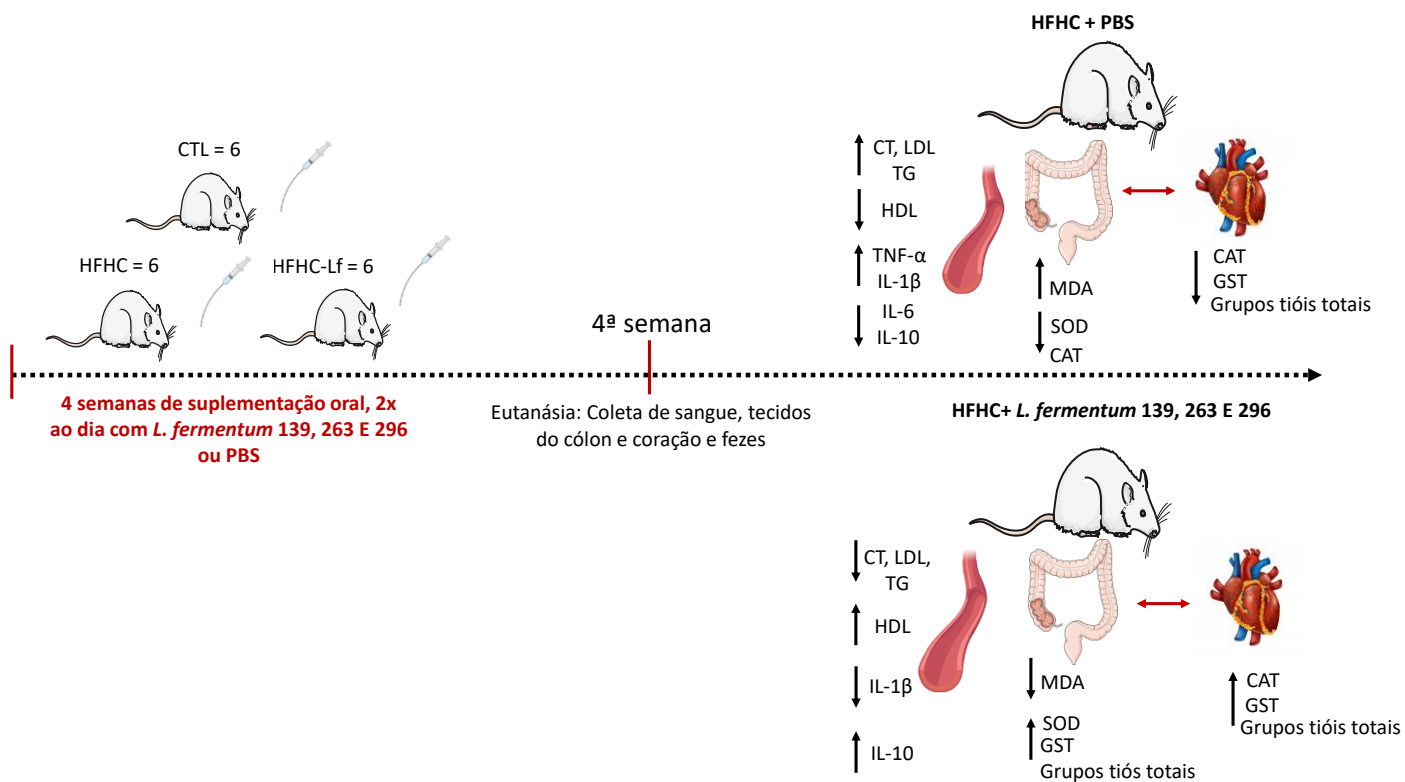
A suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 conseguiu promover maior atividade de CAT e GST quando comparado ao grupo HFHC, além disso, a concentração de grupamentos tióis totais foi significativamente maior com a suplementação, reforçando que essas cepas probióticas apresentam ações antioxidantes. Outros estudos também demonstraram os efeitos de probióticos no coração, foi observado que cepas probióticas produziram efeitos sobre o coração de animais alimentados com HFD, reduzindo a remodelação cardíaca e diminuíram os níveis de MDA no soro e tecidos cardíacos (LAI et al., 2016; TUNAPONG et al., 2018), além dos benefícios causados pelo probiótico contendo *Lactobacillus reuteri* GMNL-263, que parecem reduzir fibrose cardíaca e melhorar a função cardíaca em hamsters (TING et al., 2015).

Os efeitos da suplementação de *Lactobacillus* no aumento das atividades de SOD, CAT, GSH e GSH peroxidase já foram observadas não apenas no soro, mas também em outros tecidos como fígado (YADAV et al., 2019; HUANG et al., 2020). Além disso, foi demonstrado que *L. fermentum* cepa ME-3 tem um sistema GSH totalmente funcional composto por GSH peroxidase e GSH redutase, sugerindo que ME-3 possui um sistema GSH completo (síntese, transporte e reciclagem redox) que efetivamente protege as células contra o estresse oxidativo (KULLISAAR et al., 2010). Também foi observado que o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um dos mecanismos de proteção mais importantes contra o estresse oxidativo em probióticos (QIAN et al., 2018; LIN et al., 2018; ZHAO et al., 2019). O Nrf2 pertence a uma subfamília de fatores de transcrição de zíper de leucina básica (QIAN et al., 2018; LIN et al., 2018; ZHAO et al., 2019). Quando a célula é exposta a estímulos estressores, tais como aumento de EROs, esse fator de transcrição é um dos responsáveis por induzir a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas antioxidantes, além de enzimas da fase II de detoxificação do metabolismo (QIAN et al., 2018; LIN et al., 2018; ZHAO et al., 2019). Estudos demonstraram que algumas cepas probióticas de bactérias ácidos lácticas podem ativar a sinalização de Nrf2 e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo SOD, catalase e heme oxigenase-1 no fígado de camundongo, aumentando assim a defesa antioxidante (QIAN et al., 2018; LIN et al., 2018; ZHAO et al., 2019).

Portanto, nossos resultados demonstram pela primeira vez que as cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296 desenvolvem atividades antioxidantes importantes no cólon do hospedeiro, promovendo menores níveis de MDA e maior atividade das enzimas, SOD e GST, e dos grupamentos tióis totais. Além de ter efeitos sistêmicos, por ser capaz de atenuar inflamação sistêmica de baixo grau por prevenir aumento de IL-1 β e diminuição das concentrações séricas de IL-10, além de ser capaz de induzir maior atividade de CAT, GST e quantificação de grupamentos tióis totais nos tecidos cardíacos.

Nossos resultados sugerem que nossa formulação probiótica configura intervenção promissora para manejo de distúrbios metabólicos e DCVs. Dessa forma, os próximos passos serão avaliar a toxicidade dessas cepas probióticas, para possibilitar a elaboração de estudos clínicos, com o intuito de investigar os efeitos dessas cepas probióticas em humanos.

Figura 11. Resumo sobre os resultados da suplementação de *L. fermentum* 139, 263 e 296 ou PBS



Fonte: Autor, 2021. Esquema demonstrando os resultados sobre o impacto da dieta materna com alto teor de gordura e colesterol e da suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 no perfil lipídico, marcadores inflamatórios e no estresse oxidativo ao longo do eixo intestino-coração de ratos. CT (colesterol total); LDL (lipoproteína de baixa densidade); HDL (lipoproteína de alta densidade); TG (triglicerídeos); TNF-α (fator de necrose tumoral); IL-1β (interleucina 1-beta); IL-10 (interleucina 10); IL-6 (interleucina 6); GST (glutathione S-transferase); MDA (malondialdeído); CAT (catalase); SOD (superóxido dismutase).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados, observa-se que a intervenção com as cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296 por 4 semanas foi capaz de produzir efeitos hipocolesterolêmicos, e ainda aumentar os níveis de HDL, sugerindo que essas cepas apresentam efeitos positivos na dislipidemia. A administração oral dessa formulação probiótica também foi capaz de promover melhora na inflamação de baixo grau, através da modulação de citocina pró- e anti-inflamatória, demonstrando a capacidade das cepas na melhora da resposta inflamatória. Além disso, a suplementação com *L. fermentum* 139, 263 e 296 conseguiu promover redução de estresse oxidativo em tecidos do cólon, através da redução de MDA e aumento da atividade de enzimas antioxidantes e quantidade de grupamentos tióis totais, assim como, foi capaz de aumentar atividade de enzimas antioxidantes nos tecidos cardíacos e grupamentos tióis totais de ratos dislipidêmicos, demonstrando as propriedades antioxidantes dessas cepas probióticas.

Esse estudo demonstrou de maneira inédita as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes das cepas probióticas *L. fermentum* 139, 263 e 296, sendo uma possível estratégia terapêutica para prevenção de doenças metabólicas e cardiovasculares, ou ainda, um tratamento adjuvante para esses distúrbios cardiometabólicos.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, Kjersti et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science translational medicine**, v. 6, n. 237, p. 237ra65-237ra65, 2014.

ADAM, Aline et al. Whole wheat and triticale flours with differing viscosities stimulate cecal fermentations and lower plasma and hepatic lipids in rats. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1770-1776, 2001.

AEBI, H., Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.

AGUS, Allison et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

AKAGAWA, Shohei et al. Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in neonates. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 132-139, 2019.

AGRIOPOULOU, S. et al., Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. **Microorganisms**, v. 8, n. 952, p. 1-23, 2020.

AMINLARI, Ladan et al. Effect of probiotics *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on lipid profile and feces bacteria of rats fed cholesterol-enriched diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 4, p. 1163-1171, 2019.

ARON-WISNEWSKY, Judith et al. Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health: Pathophysiology and Therapeutic Strategies. **Gastroenterology**, 2020.

ARRIBAS, B. Rodríguez-Cabezas ME, Comalada M, Bailoñ E, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A and Gañvez J. Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. **British J of Nutri**, v. 101, p. 51-58, 2009.

BALL S.; Lloyd L. Agilent Hi-Plex columns for carbo-hydrates, alcohols, and acids. In *Analysis of Carbohydrates, Alcohols, and Organic Acids by Ion-Exchange Chromato-graphy*, pp. 1–98 [Agilent Technologies Inc., editor]. SantaClara, CA: Agilent Technologies Inc, 2011.

BARTON, Wiley et al. The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. **Gut**, v. 67, n. 4, p. 625-633, 2018.

BATISTA, Kamila Sabino 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**, v. 119, n. 1, p. 30, 2018.

BEGLEY, Máire; HILL, Colin; GAHAN, Cormac GM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.

BENGMARK, Stig. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, n. 1, p. 2-7, 1998.

BHARDWAJ, Rabia et al. Probiotic mediated NF- κ B regulation for prospective management of type 2 diabetes. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 3, p. 2301-2313, 2020.

BLAND J. M.; Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. **Stat Methods Med Res**, v. 8, n. 2, p. 135–160, 1999.

BLUM, Hubert E. The human microbiome. **Advances in medical sciences**, v. 62, n. 2, p. 414-420, 2017.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAHM, Paulina; VALDÉS, Verónica. The benefits of breastfeeding and associated risks of replacement with baby formulas. **Revista chilena de pediatría**, v. 88, n. 1, p. 7-14, 2017.

BRAVO, Javier A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16050-16055, 2011.

BROWNLEE, Iain A. et al. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 800-808, 2007.

BUBNOV, Rostyslav V. et al. Comparative study of probiotic effects of Lactobacillus and Bifidobacteria strains on cholesterol levels, liver morphology and the gut microbiota in obese mice. **EPMA Journal**, v. 8, n. 4, p. 357-376, 2017.

CAESAR, Robert et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, n. 12, p. 1701-1707, 2012.

CAMPESE, Vito M.; SHAOHUA, Y. E.; HUIQUIN, Zhong. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. **Hypertension**, v. 46, n. 3, p. 533-539, 2005.

CANANI, Roberto Berni et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 12, p. 1519, 2011.

CANANI, Roberto Berni; DI COSTANZO, Margherita; LEONE, Ludovica. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. **Clinical epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2012.

CANI, Patrice D. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2374-2383, 2007.

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

CARDING, Simon et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 26191, 2015.

CARMODY, Rachel N. et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 1, p. 72-84, 2015.

CASTELLI, W.P., R.D. Abbott; P.M. McNamara, Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**, v. 67, n. 4, p. 730-4, 1983.

CATAPANO, A. L.; GRAHAM, I.; DE BACKER, G et al. Guidelines for the Management of Dyslipidemias: The Task Force for the Management of Dyslipidemia of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **European Heart Journal**, 2016.

CAVALCANTE, Raíssa GS et al. The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1408-1417, 2019.

CHABÉ, Magali; LOKMER, Ana; SÉGUREL, Laure. Gut protozoa: friends or foes of the human gut microbiota?. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 925-934, 2017.

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.

CHEN, Juan Juan; YU, Byung Pal. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 5, p. 411-418, 1994.

COLLADO, M. Carmen et al. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. **Journal of food protection**, v. 68, n. 12, p. 2672-2678, 2005.

COLLINS, A. R.; HORVATHOVA, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. 2001.

CONLON, Michael A.; BIRD, Anthony R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, 2015.

COSTABILE, Adele et al. An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0187964, 2017.

COSTELLO, Elizabeth K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

CREELY, Steven James et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 3, p. E740-E747, 2007.

CRESCI, Gail A.; BAWDEN, Emmy. Gut microbiome: what we do and don't know. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 6, p. 734-746, 2015.

DAS, Kaushik; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental science**, v. 2, p. 53, 2014.

DAVID, Lawrence A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, 2014.

DE ALBUQUERQUE, Thatyane Mariano Rodrigues et al. In vitro characterization of Lactobacillus strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 4, p. 704-716, 2018.

DE LA SERRE, Claire Barbier et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. G440-G448, 2010.

DE LIMA GUIMARÃES, Keyth Sulamitta et al. Lactiplantibacillus plantarum WJL administration during pregnancy and lactation improves lipid profile, insulin sensitivity and gut microbiota diversity in dyslipidemic dams and protects male offspring against cardiovascular dysfunction in later life. **Food & Function**, v. 11, n. 10, p. 8939-8950, 2020.

DE OLIVEIRA, Yohanna et al. Oral administration of Lactobacillus fermentum post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food & Function**, v. 11, n. 6, p. 5581-5594, 2020.

DEN BESTEN, Gijs et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

DESHASAU, Mélanie et al. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. **Nature medicine**, v. 24, n. 10, p. 1526-1531, 2018.

DETHLEFSEN, Les; RELMAN, David A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4554-4561, 2011.

DEWULF, Evelyne M. et al. Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR γ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 712-722, 2011.

DILMI-BOURAS, Abdelkader. Assimilation (in vitro) of cholesterol by yogurt bacteria. **Annals of agricultural and environmental medicine**, v. 13, n. 1, p. 49, 2006.

DO NASCIMENTO, Luciana Caroline Paulino et al. Maternal exposure to high-fat and high-cholesterol diet induces arterial hypertension and oxidative stress along the gut-kidney axis in rat offspring. **Life Sciences**, v. 261, p. 118367, 2020.

DOBIASOVA, M., Atherogenic index of plasma [$\log(\text{triglycerides}/\text{HDL-cholesterol})$]: theoretical and practical implications. **Clin Chem**, v. 50, n. 7, p. 1113-5, 2004.

DONOHUE, Dallas R. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517-526, 2011.

ECKBURG, Paul B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EDER, Katalin et al. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. **Inflammation Research**, v. 58, n. 11, p. 727-736, 2009.

ELLMAN, G.L., Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

ELSON, Greg et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1574-1583, 2007.

ENAS, Enas A. et al. Dyslipidemia in south Asian patients. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 9, n. 5, p. 367-374, 2007.

ESSER, Nathalie; PAQUOT, Nicolas; SCHEEN, Andre J. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 3, p. 283-307, 2015

FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FENG, Jing et al. Diversity and evolution of Lactobacillus casei group isolated from fermented dairy products in Tibet. **Archives of microbiology**, v. 200, n. 7, p. 1111-1121, 2018.

FRIEDEWALD, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FROST, Gary et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2014.

FU, Jingyuan et al. The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. **Circulation research**, v. 117, n. 9, p. 817-824, 2015.

FURUSAWA, Yukihiro et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446-450, 2013.

GAO, Zhanguo et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1509-1517, 2009.

GARCIA, Estefânia F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1371, 2016.

GAZIANO, Thomas A. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. **Circulation**, v. 112, n. 23, p. 3547-3553, 2005.

GEORGE, F.; et al. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. **Frontiers in Microbiology**, pre-proof, p. 2890-2899, 2018.

GERRITSEN, Jacoline et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & nutrition**, v. 6, n. 3, p. 209-240, 2011.

GHAZARYAN L et al. The role of stress in colicin regulation. **Arch Microbiol**, v. 196, n. 11, p. 753–764, 2014.

GHOSH, Arnab; SHCHERBIK, Natalia. Effects of Oxidative Stress on Protein Translation: Implications for Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2661, 2020.

GIOACCHINI, Giorgia et al. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 98-106, 2014.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Clinical indications for probiotics: an overview. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_2, p. S96-S100, 2008.

GÓMEZ-GUZMÁN, Manuel et al. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. **Molecular nutrition & food research**, v. 59, n. 11, p. 2326-2336, 2015.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Irene et al. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3992-3998, 2012.

GOODRICH, Julia K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 789-799, 2014.

GU, Chun Tao et al. *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4698-4706, 2013.

GUO, C. F.; LI, J. Y. Hypocholesterolaemic action of *Lactobacillus casei* F0822 in rats fed a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 144-149, 2013.

GUPTA, R. et al. Epidemiology and causation of coronary heart disease and stroke in India. **Heart**, v. 94, n. 1, p. 16-26, 2008.

HABIG, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, 1974.

HALL, John E. **Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia**. Elsevier Brasil, 2017.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARO, Carmen et al. Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154090, 2016.

HASSAN, Adil et al. Anti-atherosclerotic effects of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 in ApoE^{-/-} mice through modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6337-6350, 2020.

HENAGAN, Tara M. et al. Sodium butyrate epigenetically modulates high-fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2782-2798, 2015.

HILL, Colin et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.

HOU, Yuanlong et al. A diet-microbial metabolism feedforward loop modulates intestinal stem cell renewal in the stressed gut. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

HSIEH, Chen-Yu et al. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. **Physiological reports**, v. 3, n. 3, 2015.

HUANG, Ying et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 prevents atherosclerosis via inhibition of intestinal cholesterol absorption in apolipoprotein E-knockout mice. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7496-7504, 2014.

HUANG, Yujun et al. The effect of *Lactobacillus fermentum* DALI02 in reducing the oxidative stress and inflammatory response induced by high-fat diet of rats. **RSC Advances**, v. 10, n. 57, p. 34396-34402, 2020.

HUSSAIN, Tarique et al. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

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

IANIRO, Gianluca et al. Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 28, p. 4565-4569, 2014.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clinical nutrition**, v. 29, n. 6, p. 701-725, 2010.

IMLAY, James A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 755-776, 2008.

IOANNOU, George N. The role of cholesterol in the pathogenesis of NASH. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 84-95, 2016.

JIANG, Weiwei et al. Artesunate attenuated progression of atherosclerosis lesion formation alone or combined with rosuvastatin through inhibition of pro-inflammatory cytokines and pro-inflammatory chemokines. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1259-1266, 2016.

JONES, Brian V. et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, n. 36, p. 13580-13585, 2008.

JONES, Mitchell L. et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 10, p. 1505-1513, 2012.

JONES, Mitchell Lawrence et al. Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, 2003.

JOVANOVIĆ, Anna et al. Deoxycholic acid, a metabolite of circulating bile acids, and coronary artery vascular calcification in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 1, p. 27-34, 2018.

KAMO, Takehiro et al. Novel concept of a heart-gut axis in the pathophysiology of heart failure. **Korean circulation journal**, v. 47, n. 5, p. 663, 2017.

KANG, Ji-Hee et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54617, 2013.

KARARLI, Tugrul T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 16, n. 5, p. 351-380, 1995.

KASSAN, Modar et al. Interleukin-10 released by CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 11, p. 2534-2542, 2011.

KELDER, T. et al. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. **Nutrition & diabetes**, v. 4, n. 6, p. e122-e122, 2014.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. **Nutrition research reviews**, v. 31, n. 1, p. 35-51, 2018.

KIMOTO, Hiromi; OHMOMO, Sadahiro; OKAMOTO, Takashi. Cholesterol removal from media by lactococci. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 12, p. 3182-3188, 2002.

KONG, Yanzhuo et al. The potential of *Lactobacillus* spp. for modulating oxidative stress in the gastrointestinal tract. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 610, 2020.

KÖNIG, Julia et al. Human intestinal barrier function in health and disease. **Clinical and translational gastroenterology**, v. 7, n. 10, p. e196, 2016.

KRISHNA RAO, Radha; SAMAK, Geetha. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. **Current Nutrition & Food Science**, v. 9, n. 2, p. 99-107, 2013.

KULLISAAR, T. et al. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 46, n. 5, p. 481-486, 2010.

KULLISAAR, Tiiu et al. The use of probiotic *L. fermentum* ME-3 containing Reg'Activ Cholesterol supplement for 4 weeks has a positive influence on blood lipoprotein profiles and inflammatory cytokines: an open-label preliminary study. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2016.

KUMAR, Manoj et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2012.

KURATSU, Masahiro; HAMANO, Yoshimitsu; DAIRI, Tohru. Analysis of the *Lactobacillus* metabolic pathway. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7299-7301, 2010.

KUZU, Omer F.; NOORY, Mohammad A.; ROBERTSON, Gavin P. The role of cholesterol in cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 8, p. 2063-2070, 2016.

LAI, Chao-Hung et al. Multi-strain probiotics inhibit cardiac myopathies and autophagy to prevent heart injury in high-fat diet-fed rats. **International journal of medical sciences**, v. 13, n. 4, p. 277, 2016.

LANDSBERG, L. et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment--a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 21, n. 1, p. 8-24, jan. 2013.

LE ROY, Tiphaine et al. The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2019.

LI, Wenyan et al. Fasting serum total bile acid level is associated with coronary artery disease, myocardial infarction and severity of coronary lesions. **Atherosclerosis**, v. 292, p. 193-200, 2020.

LI, Xue et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 317, n. 4, p. G453-G462, 2019.

LIANG, Shi et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 310, p. 561-577, 2015.

LIN L. I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v. 45, n. 1, p. 255-268, 1989.

LIN, Hua V. et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35240, 2012.

LIN, Xiangna et al. *Lactobacillus plantarum* AR501 Alleviates the Oxidative Stress of D-Galactose-Induced Aging Mice Liver by Upregulation of Nrf2-Mediated Antioxidant Enzyme Expression. **Journal of food science**, v. 83, n. 7, p. 1990-1998, 2018.

LINNINGE, C. et al. Lactobacillus fermentum and Lactobacillus plantarum increased gut microbiota diversity and functionality, and mitigated Enterobacteriaceae, in a mouse model. **Beneficial microbes**, v. 10, n. 4, p. 413-424, 2019.

LITTLE, Tanya J.; FEINLE-BISSET, Christine. Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity—oral and gastrointestinal sensory contributions. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 4, p. 613-620, 2011.

LIU, Songling et al. Probiotic strains improve high-fat diet-induced hypercholesterolemia through modulating gut microbiota in ways different from atorvastatin. **Food & function**, v. 10, n. 9, p. 6098-6109, 2019.

LIU, Yen-Wenn et al. Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. **Brain research**, v. 1631, p. 1-12, 2016.

LU, Yong-Chen; YEH, Wen-Chen; OHASHI, Pamela S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

MALOY, Kevin J.; POWRIE, Fiona. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, 2011.

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

MANRIQUE VERGARA D.; González Sánchez M. E. Short chain fatty acids (butyric acid) and intestinal diseases. **Nutricion Hospitalaria**, v. 34, n. Suppl 4, p. 58-61, 2017.

MAO, Bingyong et al. In vitro fermentation of raffinose by the human gut bacteria. **Food & function**, v. 9, n. 11, p. 5824-5831, 2018.

MARCHESI, Julian R. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330-339, 2016.

MARTINEZ, Kristina B.; LEONE, Vanessa; CHANG, Eugene B. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked?. **Gut microbes**, v. 8, n. 2, p. 130-142, 2017.

MARTIROSYAN, D.M., et al., Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. **Lipids Health Dis**, n. 6, p. 1, 2007.

MATSUZAWA-NAGATA, Naoto et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

MAYNARD, Craig L. et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 931-941, 2007.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 2, p. 175-191, 2003.

MILANI, Christian et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, 2017.

MILLER, Michelle A. et al. Ethnic and sex differences in circulating endotoxin levels: A novel marker of atherosclerotic and cardiovascular risk in a British multi-ethnic population. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 2, p. 494-502, 2009.

MISRA, H.P. and I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.

MO, Rui; ZHANG, Xingwei; YANG, Yunsheng. Effect of probiotics on lipid profiles in hypercholesterolaemic adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 152, n. 12, p. 473-481, 2019.

MOREIRA, Ana Paula Boroni et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801-809, 2012.

MORRISON, Douglas J.; PRESTON, Tom. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut microbes**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2016.

MURPHY, E. Angela; VELAZQUEZ, Kandy T.; HERBERT, Kyle M. Influence of high-fat-diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 5, p. 515, 2015.

NAABER, Paul; MIKELSAAR, Marika. Interactions between Lactobacilli and antibiotic-associated diarrhea. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 231-260, 2004.

NAEEM, MAHROSH et al. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. **Pak J Bot**, v. 44, n. 323, p. 8, 2012.

NAGATOMO, Yuji; TANG, WH Wilson. Intersections between microbiome and heart failure: revisiting the gut hypothesis. **Journal of cardiac failure**, v. 21, n. 12, p. 973-980, 2015.

NATIVIDAD, Jane MM; VERDU, Elena F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacological research**, v. 69, n. 1, p. 42-51, 2013.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Principios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEMATOLLAHI, Amene et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49-53, 2016.

NEUMAN, Hadar; KOREN, Omry. The pregnancy microbiome. In: **Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease**. Karger Publishers, 2017. p. 1-10.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 30 ago. 2014.

NIDO, Sonia Agostinho et al. Effects of selenium-enriched probiotics on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in mice fed a high-fat diet. **Biological trace element research**, v. 171, n. 2, p. 399-409, 2016.

NISHIYAMA, Keita; SUGIYAMA, Makoto; MUKAI, Takao. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, p. 34, 2016.

OELSCHLAEGGER, Tobias A. Mechanisms of probiotic actions—a review. **International journal of medical microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57-62, 2010.

OHLAND, Christina L. et al. Effects of *Lactobacillus helveticus* on murine behavior are dependent on diet and genotype and correlate with alterations in the gut microbiome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1738-1747, 2013.

ORTEGA, Miguel A. et al. Type 2 Diabetes Mellitus Associated with Obesity (Diabesity). The Central Role of Gut Microbiota and Its Translational Applications. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2749, 2020.

OUWEHAND, Arthur C. Antiallergic effects of probiotics. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3, p. 794S-797S, 2007.

PALANIYANDI, Sasikumar Arunachalam et al. Probiotic Characterization of Cholesterol-Lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-12, 2019.

PAREKH, Parth J.; BALART, Luis A.; JOHNSON, David A. The influence of the gut microbiome on obesity, metabolic syndrome and gastrointestinal disease. **Clinical and translational gastroenterology**, v. 6, n. 6, p. e91, 2015.

PARK, Do-Young 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. 8, n. 3, p. e59470, 2013.

PASTORI, Daniele et al. Gut-derived serum lipopolysaccharide is associated with enhanced risk of major adverse cardiovascular events in atrial fibrillation: Effect of adherence to mediterranean diet. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 6, p. e005784, 2017.

PAVLOVIĆ, Nebojša; STANKOV, Karmen; MIKOV, Momir. Probiotics—interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 7, p. 1880-1895, 2012.

PEDROZA, A., et al., A maternal low-protein diet and neonatal overnutrition result in similar changes to glomerular morphology and renal cortical oxidative stress measures in male Wistar rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 44, n. 2, p. 164-171, 2019.

PEKMEZ, Ceyda Tugba; DRAGSTED, Lars Ove; BRAHE, Lena Kirchner. Gut microbiota alterations and dietary modulation in childhood malnutrition—the role of short chain fatty acids. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 615-630, 2019.

PERES, Cátia M. et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria—with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 31-42, 2012.

PEREZ-CANO, Francisco J.; DONG, Honglin; YAQOOB, Parveen. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. **Immunobiology**, v. 215, n. 12, p. 996-1004, 2010.

PERRY, Rachel J. et al. Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 213-217, 2016.

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. 121, n. 7, p. 721-734, 2019.

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

PLUZNICK, Jennifer L. et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 11, p. 4410-4415, 2013.

PREEDY, Victor R. **Bioactive foods in promoting health: Probiotics and prebiotics**. Academic Press, 2010.

PUSSINEN, Pirkko J. et al. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. **Diabetes care**, v. 34, n. 2, p. 392-397, 2011.

QIAN, Y. U. et al. *Lactobacillus plantarum* CQPC11 isolated from Sichuan pickled cabbages antagonizes d-galactose-induced oxidation and aging in mice. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 3026, 2018.

QIAO, Yi et al. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1689-1697, 2013.

RAETZ, Christian RH; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635-700, 2002.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, Mirjana et al. Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences, or epiphenomena?. **The American journal of gastroenterology**, v. 110, n. 2, p. 278, 2015.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food research international**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.

REEVES, Philip G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G. C. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REID, Gregor et al. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 49-52, 2001.

ROBERFROID, Marcel et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

ROMÃO DA SILVA, Larissa de Fátima et al. Effects of probiotic therapy on cardio-metabolic parameters and autonomic modulation in hypertensive women: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. **Food & Function**, v. 11, n. 8, p. 7152-7163, 2020.

ROWLAND, Ian et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1-24, 2018.

RYAN, Paul M. et al. Functional food addressing heart health: do we have to target the gut microbiota?. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 6, p. 566-571, 2015.

SAARELA, Maria et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SAITO, Harumi et al. Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. **Science signaling**, v. 2, n. 60, p. ra9-ra9, 2009.

SARTOR, R. Balfour; MAZMANIAN, Sarkis K. Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. **The American journal of gastroenterology supplements**, v. 1, n. 1, p. 15, 2012.

SAULNIER, Delphine M. et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18783, 2011.

SHELLER, Jürgen et al. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHARMA, Smriti et al. Potential of probiotics in hypercholesterolemia: A meta-analysis. **Indian journal of public health**, v. 60, n. 4, p. 280, 2016.

SHCHERBIK, Natalia; PESTOV, Dimitri G. The impact of oxidative stress on ribosomes: From injury to regulation. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1379, 2019.

SHEEHAN, Vivien M.; ROSS, P.; FITZGERALD, Gerald F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279-284, 2007.

SIRCANA, Antonio et al. Gut microbiota, hypertension and chronic kidney disease: recent advances. **Pharmacological research**, v. 144, p. 390-408, 2019.

SONG, Jiao J. et al. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1 on the gut microbiota of hyperlipidaemic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 7, p. 481-492, 2017.

SONG, Wei et al. The antioxidative effects of three lactobacilli on high-fat diet induced obese mice. **RSC advances**, v. 6, n. 70, p. 65808-65815, 2016.

SONNENBURG, Erica D. et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 212-215, 2016.

SUDHAKARA, G. et al. Caralluma fimbriata and metformin protection of rat pancreas from high fat diet induced oxidative stress. **Biotechnic & histochemistry**, v. 93, n. 3, p. 177-187, 2018.

SUN, Jin et al. Inhibition of Fe-induced colon oxidative stress by lactobacilli in mice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 209-216, 2013.

SUN, Mingming et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of gastroenterology**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2017.

TAKADA, M. et al. Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut–brain interaction in human and animal models. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n. 7, p. 1027-1036, 2016.

THURSBY, Elizabeth; JUGE, Nathalie. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

THUSHARA, Ram Mohan et al. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. **Food & function**, v. 7, n. 2, p. 632-642, 2016.

TIAN, Fengwei et al. Lactobacillus rhamnosus CCFM1107 treatment ameliorates alcohol-induced liver injury in a mouse model of chronic alcohol feeding. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 856-863, 2015.

TING, Wei-Jen et al. Supplementary heat-killed Lactobacillus reuteri GMNL-263 ameliorates hyperlipidaemic and cardiac apoptosis in high-fat diet-fed hamsters to maintain cardiovascular function. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 5, p. 706-712, 2015.

TOMARO-DUCHESNEAU, Catherine et al. Cholesterol assimilation by Lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

TOMASELLO, Giovanni et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: changes in response of colocytes. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 48, p. 18121, 2014.

TOMASELLO, Giovanni et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 160, n. 4, p. 461-6, 2016.

TOMUSIAK-PLEBANEK, Anna et al. Lactobacilli with superoxide dismutase-like or catalase activity are more effective in alleviating inflammation in an inflammatory bowel disease mouse model. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 3221, 2018.

TRALONGO, Pietro et al. The role of butyric acid as a protective agent against inflammatory bowel diseases. **Euromediterranean biomedical journal**, v. 9, 2014.

TREMAROLI, Valentina; BÄCKHED, Fredrik. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-249, 2012.

TROMPETTE, Aurélien et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature medicine**, v. 20, n. 2, p. 159-166, 2014.

TSUKUMO, Daniela ML et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-1998, 2007.

TUNAPONG, Wannipa et al. Chronic treatment with prebiotics, probiotics and synbiotics attenuated cardiac dysfunction by improving cardiac mitochondrial dysfunction in male obese insulin-resistant rats. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2091-2104, 2018.

VALKO, Marian et al. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 1, p. 1-37, 2016.

VALLEJO-VAZ, Antonio J. et al. LDL-Cholesterol Lowering for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease Among Men with Primary Elevations of LDL-Cholesterol Levels of 190 mg/dL or Above: Analyses from the WOSCOPS 5-year Randomised Trial and 20-year Observational Follow-Up. **Circulation**, v. 136, n. 20, p. 1878-91, 2017.

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

WANG, Bao-gui et al. Oral administration of Bifidobacterim bifidum for modulating microflora, acid and bile resistance, and physiological indices in mice. **Canadian journal of microbiology**, v. 61, n. 2, p. 155-163, 2015.

WANG, Huiying et al. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: a systematic review. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 22, n. 4, p. 589, 2016.

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

WANG, Lifeng et al. Effect of oral consumption of probiotic Lactobacillus planatarum P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 776-783. e1, 2014.

WANG, Li-Xin et al. Protective effects of two Lactobacillus plantarum strains in hyperlipidemic mice. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 20, p. 3150, 2013.

WANG, T. et al. Lactobacillus fermentum NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 5, p. 707-717, 2015.

WANG, Yuzhen et al. Protective effects of probiotic Lactobacillus casei Zhang against endotoxin-and d-galactosamine-induced liver injury in rats via anti-oxidative and anti-inflammatory capacities. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 30-37, 2013.

WARMBRUNN, Moritz V. et al. Gut microbiota: a promising target against cardiometabolic diseases. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 15, n. 1, p. 13-27, 2020.

WEISS, G. Adrienne; HENNET, Thierry. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2959-2977, 2017.

WELLS, Jerry M. et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 3, p. G171-G193, 2017.

WIEËRS, Grégoire et al. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 454, 2020.

WONG, Julia MW et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235-243, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Cardiovascular disease; fact. **Sheet n_317. WHO, Geneva**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. World Health Organization, 2009.

WU, Chien-Chen et al. Effect of Lactobacillus plantarum strain K21 on high-fat diet-fed obese mice. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, 2015.

YADAV, Radha et al. Consumption of probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-fermented milk attenuates dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in male rats fed on cholesterol-enriched diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 2, p. 509-518, 2019.

YANG, Tao et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. **Hypertension**, v. 65, n. 6, p. 1331-1340, 2015.

YOO, Ji Youn; KIM, Sung Soo. Probiotics and prebiotics: present status and future perspectives on metabolic disorders. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 173, 2016.

YOO, Sae-Rom et al. Probiotics L. plantarum and L. curvatus in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. 2571-2578, 2013.

YOSHIDA, Naofumi et al. Bacteroides vulgatus and Bacteroides dorei reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. **Circulation**, v. 138, n. 22, p. 2486-2498, 2018.

YU, Zhuo-Teng et al. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. **Glycobiology**, v. 23, n. 2, p. 169-177, 2013.

YUSUF, Salim et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **The lancet**, v. 364, n. 9438, p. 937-952, 2004.

ZHAO, Zijian et al. Lactobacillus plantarum NA136 improves the non-alcoholic fatty liver disease by modulating the AMPK/Nrf2 pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5843-5850, 2019.

ZHENG, Jinshui et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHENG, Jinshui et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHONG, Z. et al. The impact of timing of maternal influenza immunization on infant antibody levels at birth. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 195, n. 2, p. 139-152, 2019.

ZHOU, Xiaodong et al. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 4, p. 667-674, 2015.

ZHU, Ying et al. Gut microbiota metabolites as integral mediators in cardiovascular diseases. **International journal of molecular medicine**, v. 46, n. 3, p. 936-948, 2020.

ZHUANG, Guo et al. Research advances with regards to clinical outcome and potential mechanisms of the cholesterol-lowering effects of probiotics. **Clinical Lipidology**, v. 7, n. 5, p. 501-507, 2012.