

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

LUCAS ALVES CARNEIRO DOS SANTOS

**RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MIX DE CEPAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS (*Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296) NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATOS *WISTAR* MACHOS E FÊMEAS**

João Pessoa – PB

2023

LUCAS ALVES CARNEIRO DOS SANTOS

**RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MIX DE CEPAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS (*Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296) NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATOS *WISTAR* MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como requisito obrigatório para conclusão do curso de Mestrado em Ciências da Nutrição.

Linha de pesquisa: Intervenção e diagnóstico nutricional.

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

João Pessoa – PB


2023

LUCAS ALVES CARNEIRO DOS SANTOS


**RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MIX DE CEPAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS (*Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296) NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATOS *W1STAR* MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação de mestrado defendida em 26/10/2023


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JOSE LUIZ DE BRITO ALVES**
Data: 24/09/2024 16:26:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **FILLIPE DE OLIVEIRA PEREIRA**
Data: 30/10/2023 16:19:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Examinador interno titular

Documento assinado digitalmente
 **KEYTH SULAMITTA GUIMARAES DE ALBUQUER**
Data: 30/10/2023 16:03:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Keyth Sulamitta de Lima Guimarães
Examinador externo titular

Profa. Dra. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira
Examinador interno suplente

Profa. Dra. Luciana Caroline Paulino do Nascimento
Examinador externo suplente

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C289r Santos, Lucas Alves Carneiro dos.

Relação dose-resposta de um mix de cepas potencialmente probióticas (*limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296) na microbiota intestinal de ratos wistar machos e fêmeas / Lucas Alves Carneiro dos Santos. - João Pessoa, 2023.

69 f. : il.

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

1. Probióticos. 2. *Limosilactobacillus fermentum*. 3. Microbioma gastrointestinal. I. Alves, José Luiz de Brito Alves. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-008.87(043)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e aos professores que o integram, por contribuírem com o meu crescimento profissional. Juntamente pela participação da equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição e Laboratório de Nutrição Experimental.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, professores Keyth Sulamitta, Fillipe de Oliveira e Kataryne Árabe pela disponibilidade e contribuição para minha dissertação.

À toda equipe do LANUCAM, em especial aos amigos Micaelle Oliveira por ter sido acolhedora e essencial para sustentar minha motivação, discernimento e contribuir para uma melhor escrita do trabalho, e José Patrocínio Neto por contribuir com a execução dos resultados apresentados. E em especial ao nosso orientador José Luiz por ter sido humano, amigo e conselheiro em um momento que enfrentei diversas dificuldades durante o período do curso e por toda sua contribuição em minha formação profissional em mais de 5 anos de orientação da graduação até o mestrado.

E um agradecimento especial aos membros da minha família e aos amigos próximos por serem as pessoas mais importantes em minha vida, participando de diversos momentos essenciais para minha formação como pessoa e profissional. Em especial aos meus pais Lena e Joel, minha irmã Alana, meus avós Gustavo (*in memoriam*) e Rosa, meus sobrinhos Rayssa, Rayane, Felipe, Pedro, Kauã e Ravi, e minha namorada Maria Eduarda.

E acima de todos, agradeço à Deus por ter me conduzido até aqui. Durante o período desse mestrado enfrentei a pior fase da minha vida pessoal, com 5 cirurgias, 40 dias de hospital, diversos exames, 73 dias sem andar, mais de 100 dias com auxílio de muleta e incontáveis prejuízos à saúde mental, mas enfrentar isso trouxe muito amadurecimento. Foi muito difícil lidar com essa situação, mas com a força e discernimento vindo de Deus consegui enfrentar todos os desafios pessoais e profissionais para chegar até aqui, sempre buscando o melhor para mim. O amor e os planos de Deus são maiores do que qualquer coisa que podemos descobrir e entender.

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados adequadamente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Cepas de *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, e 296 potencialmente probióticas foram isoladas de subprodutos de frutas e caracterizadas em experimentos *in vivo* como imunomoduladoras, antioxidantes e hipolipemiantes. Apesar dos achados relevantes, ainda não foi elucidado se o mix com as três cepas de *L. fermentum* modula a microbiota intestinal de maneira dependente de dose e sexo. O presente trabalho objetivou avaliar a resposta da composição e diversidade da microbiota intestinal de ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos e fêmeas saudáveis com a administração de diferentes doses do mix probiótico composto por *Limosilactobacillus Fermentum* 139, 263 e 296. Trinta ratos *Wistar* (15 machos e 15 fêmeas) foram divididos em grupo controle (CTL), que recebeu soro fisiológico como placebo, grupo recebendo uma dose de 10^8 UFC/mL do mix de *L. fermentum* (Lf- 10^8) e o terceiro grupo que recebeu uma dose de 10^{10} UFC/mL do mix de *L. fermentum* (Lf- 10^{10}) por 90 dias. Após esse período a composição da microbiota intestinal foi avaliada através de sequenciamento genético. O mix probiótico não modificou a proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* em fêmeas, mas a administração nos grupos Lf- 10^8 e Lf- 10^{10} foi capaz de reduzir essa proporção em ratos machos. Também foi visto uma mudança na abundância relativa em filo, família e gênero de bactérias. Foi observado uma relação do aumento da abundância relativa de *Lachnospiraceae* com menores níveis de IL-1 β , além da relação de maior abundância relativa de *Lactobacillaceae* com aumento dos níveis de IL-10. O tratamento na dosagem de Lf- 10^{10} também aumentou a diversidade alfa na microbiota intestinal de ratos machos. É possível concluir que o tratamento com doses diferentes do mix de *L. fermentum* promoveu mudanças na microbiota intestinal de ambos os sexos relacionado a sua quantidade de filo, famílias e gêneros estudados, com associação a possíveis efeitos positivos à saúde do hospedeiro.

Palavras-chave: probióticos; *Limosilactobacillus fermentum*; microbioma gastrointestinal; dosagem; sexos.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, and 296 are potentially probiotic strains isolated from a byproduct of fruit processing, with reported immunomodulatory, antioxidant, and hypolipidemic properties. However, it is unclear whether *L. fermentum* 139, 263 and 296 modulates gut microbiota in a dose- and sex-specific manner. This study aimed to evaluate the gut microbiota composition of male and female Wistar rats after treatment with a mix of *L. fermentum* 139, 263, and 296 at different doses. Thirty Wistar rats (15 male and 15 female) were grouped into the control group (CTL), the group receiving *L. fermentum* at a dose of 10^8 CFU/mL (Lf- 10^8), and a group receiving *L. fermentum* at a dose of 10^{10} CFU/mL (Lf- 10^{10}) for 90 days. After this period, gut microbiota composition was evaluated by DNA sequencing. Administration of *L. fermentum* did not change the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in female, but administration of Lf- 10^8 or Lf- 10^{10} significantly reduced the ratio in male rats. Results also demonstrated a change in the relative abundance of bacteria at phylum, family, and genus levels. And a correlation of increase of *Lachnospiraceae* relative abundance with decrease of IL-1 β levels, and a correlation of increase of *Lactobacillaceae* relative abundance and higher levels of IL-10. The treatment with Lf- 10^{10} increased the alpha diversity of the gut microbiota of male rats. In conclusion, treatment with different doses of the potentially probiotic strains of *L. fermentum* 139, 263, and 296 in male and female rats promoted changes in the composition of the gut microbiota in both sexes, with an increase in the relative abundance of phyla, families, and genera with reported benefits for the host health.

Keywords: probiotics; *Limosilactobacillus fermentum*; gut microbiome; dosage; sexes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

- Figura 1:** Exemplo de classificação taxonômica da microbiota intestinal..... 13
- Figura 2:** Desenho experimental do estudo..... 24

FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL

- Figure 1:** Relative abundance of Phylum (left) and *Firmicutes/Bacteroides* ratio (right) in feces of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, and 296 in different doses for 90 days..... 63
- Figure 2:** Relative abundance of bacterial families in feces of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days..... 64
- Figure 3:** Relative frequency and relative abundance of Family of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days..... 65
- Figure 4:** Correlation of cytokines serum levels and relative abundance of *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days..... 67
- Figure 5:** Heat map of bacterial genus of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days..... 70
- Figure 6:** Bacterial diversity of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days..... 72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	MCIROBIOTA INTESTINAL.....	11
2.1.1	Classificação taxonômica bacteriana.....	12
2.1.2	Mecanismos de defesa da microbiota intestinal.....	14
2.2	PROBIÓTICOS.....	15
2.2.1	Fatores que influenciam os efeitos do uso de probióticos.....	16
2.3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	18
2.3.1	Evolução do mix composto por <i>L. fermentum</i> 139, 263, 296.....	19
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO E LOCAL DE PESQUISA.....	23
3.2	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	23
3.3	PREPARAÇÃO DO MIX PROBIÓTICO DE <i>L. fermentum</i>	23
3.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
3.5	EUTANÁSIA E COLETA DOS MATERIAIS.....	24
3.6	ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	25
3.7	MEDIÇÃO DE CITOCINAS.....	25
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
4	RESULTADOS.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	APÊNDICES.....	33
	APÊNDICE A – ARTIGO.....	34
	ANEXOS.....	70
	ANEXO A – Certificado de aprovação pela comissão de ética no uso de animais de laboratório (CEUA)	71

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal (MI) é composta por diversos microrganismos que formam um ecossistema no ambiente intestinal, e a partir de sua estrutura e funcionalidade pode ser relacionada com o contexto de saúde e doença. Sua composição pode ser afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos como genética do hospedeiro, dieta, idade, uso de medicamentos (principalmente antibióticos), estresse, estado de saúde, tipo de parto que foi submetido (Feng; Chen; Wang, 2018).

Além desses fatores, a composição da MI também pode ser influenciada pelo sexo (Yurkovetskiy *et al.*, 2013). Em estudo com camundongos diabéticos foi mostrado que houve uma maior abundância relativa de *Porphyromonadaceae*, *Veillonellaceae*, *Kineosporiaceae*, *Peptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Cytophagaceae*, *Peptostreptococcaceae* e *Bacteroidaceae* nos machos em relação as fêmeas (Kim *et al.*, 2020). Nos humanos, foi visto que a abundância de *Bacteroidetes* é maior nos homens, em relação a mulheres (Dominianni *et al.*, 2015).

Algumas estratégias nutricionais podem modular a MI, e entre elas destaca-se o uso de probióticos, um tratamento que tem seu conceito descrito como microrganismos vivos, que quando administrados na quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill *et al.*, 2014). A partir do conceito de quantidade adequada, alguns estudos avaliaram a administração de seus respectivos probióticos em doses diferentes de seus respectivos probióticos, objetivando definir a dose mais efetiva. Porém, existe uma lacuna ainda não estudada, que é o sexo como uma variável de resposta associado a dose (Barkhidarian *et al.*, 2021; López-Moreno *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2023; Meng *et al.*, 2019; Motevaseli *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020).

A proporção bactéria-célula humana é diferente entre os sexos, com as mulheres tendo níveis mais altos dessa proporção que os homens. Essa diferença entre os sexos pode ser explicada a partir do perfil hormonal, já que mulheres costumam desenvolver outro perfil de atividade metabólica em sua fase pós-menopausa em relação a fases mais jovens (Kim *et al.*, 2020; Yoon; Kim, 2021).

E nesse campo de pesquisa tão amplo, com fatores relacionados ao hospedeiro sendo estudados de forma variada, fatores da composição do probiótico também vem sendo mais explorados. Cepas probióticas costumam ser isoladas a partir de produtos lácteos, mas devido ao aumento de indivíduos com intolerância a lactose ou estilo de vida vegetariano, vem crescendo o desenvolvimento de probióticos a partir de outras fontes.

Como as *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296, que foram isoladas a partir de subprodutos do processamento de frutas. Essas cepas já tiveram suas características de segurança, propriedades fisiológicas e tecnológicas testadas e aprovadas em estudos *in vitro* (Albuquerque *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2016).

Posteriormente, estudos *in vivo* publicados demonstraram que em modelo animal houve associação benéfica do uso dessas cepas de *L. fermentum* melhorando fatores que quando desajustados promovem desordens metabólicas. Foi visto que a administração de um mix probiótico contendo a combinação das três cepas de *L. fermentum* na dose de 10^9 UFC/mL foi capaz de melhorar o perfil lipídico, reduzir inflamação de baixo grau e aumentar a atividade antioxidante em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (Ferreira *et al.*, 2022; Luna Freire *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2020). Frente a esse cenário, é razoável refletir que o mix contendo *L. fermentum* 139, 263 e 296 testado apenas na dose de 10^9 UFC/mL em estudos anteriores pode apresentar uma dosagem mais efetiva (Ferreira *et al.*, 2022; Luna Freire *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2020).

Aproveitando que sua segurança em doses diferentes já foi comprovada em estudo *in vivo*, faz-se necessário melhor esclarecimento de variáveis como dose e sexo do mix probiótico citado, conferindo se a alteração de doses irá gerar um impacto diferente na composição da MI de machos e fêmeas, podendo ter uma dose de maior efetividade específica para cada sexo (Cruz Neto *et al.*, 2023). É importante destacar, que apesar dos estudos avaliarem os efeitos dessas cepas em desordens cardiometabólicas, ainda não foram realizados estudos avaliando a modulação desse mix de cepas diretamente na composição de uma MI saudável.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta da composição e diversidade da microbiota intestinal de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas saudáveis com a administração de diferentes doses do mix probiótico composto por *Limosilactobacillus Fermentum* 139, 263 e 296.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

O estudo sobre microbiota intestinal é uma temática relativamente recente, do ano 2000, quando os Estados Unidos anunciaram o Projeto Genoma Humano, tido como grande feito na ciência por ter sido ponto de partida para muitos estudos sobre genética. Na época pensava-se que a genética era o caminho para o descobrimento do tratamento de diversas doenças, no entanto, descobriu-se que apenas conhecer sobre a genética não era suficiente (Pennisi, 2012).

Nesta época a maioria dos pesquisadores consideravam que o estudo de microrganismos era algo apenas de função patogênica e comensal. Porém os microbiologistas da área ambiental já observavam que os microrganismos desempenhavam funções não apenas para si, mas sim, mútua em benefícios, e que isso poderia levar a crer que os achados da área ambiental poderiam elucidar muitas questões também da área humana (Pennisi, 2012).

Em 2007, foi lançado o Projeto Microbioma Humano, uma extensão do programa anteriormente citado. Com isso, foi possível aproveitar a tecnologia de sequenciamento genético para identificar as espécies colonizadoras e as comunidades microbianas dentro do corpo humano. Os primeiros achados desse projeto foram publicados apenas em 2012, demonstrando o poder da coletividade de espécies vivendo em profunda interação, e após esse momento, houve um crescimento exponencial em torno de publicações nesta área (Forbes *et al.*, 2019; Integrative, 2014; Knight *et al.*, 2018).

Com os fatos descobertos, a microbiota intestinal (MI) se tornou bastante relevante, principalmente por sua abundância, diversidade, plasticidade e potencial metabólico. A título de comparação, seres humanos possuem aproximadamente três células bacterianas para cada célula humana, e a composição desse grupo de bactérias (microbiota) mostra-se bastante diversificada quando há comparação de indivíduos diferentes (Forbes *et al.*, 2019; Integrative, 2014; Knight *et al.*, 2018).

Embora semelhantes, é possível destacar uma diferença entre os termos microbioma e microbiota. Onde o primeiro se caracteriza por sua abrangência maior, englobando o conjunto de microrganismos, seus genes e metabólitos que habitam um ambiente ou hospedeiro, já a microbiota é algo mais restrito, caracterizando-se por ser um subconjunto de microrganismos que residem em um sítio particular do hospedeiro. A

partir disso entendemos que a microbiota faz parte do microbioma, e pode ser exemplificada em microbiota intestinal, microbiota oral e microbiota vaginal (Dominguez-Bello, 2019).

Ao dialogar sobre o estudo microbiológico de doenças humanas, a microbiota do trato gastrointestinal (TGI) ganha maior destaque. Nesse ambiente, a disponibilidade bacteriana não é homogênea, ou seja, não permanece em mesma quantidade e composição por toda região. Essa microbiota oscila ao avançar das áreas, com menores concentrações observadas no estômago, e que vai aumentando de forma crescente, na sequência de duodeno, jejuno, íleo e colón, sendo este último, o mais populoso (Paone; Cani, 2020).

A diversidade da MI é um importante medidor de sua qualidade, sendo representada como a variedade e abundância de espécies, descrita por dois itens, a riqueza, ou seja, a quantidade de espécies presentes no intestino, e em uniformidade, com base no volume de presença de cada espécie, comparando o quão abundante cada uma é (Hills *et al.*, 2019). A riqueza é um exemplo de marcador que sua queda está relacionada com síndrome metabólica, possivelmente devido ao aproveitamento melhor dos recursos disponíveis quando em alta, com cada espécie sendo mais especializada em determinados recursos (Lozupone *et al.*, 2012).

2.1.1 Classificação taxonômica bacteriana

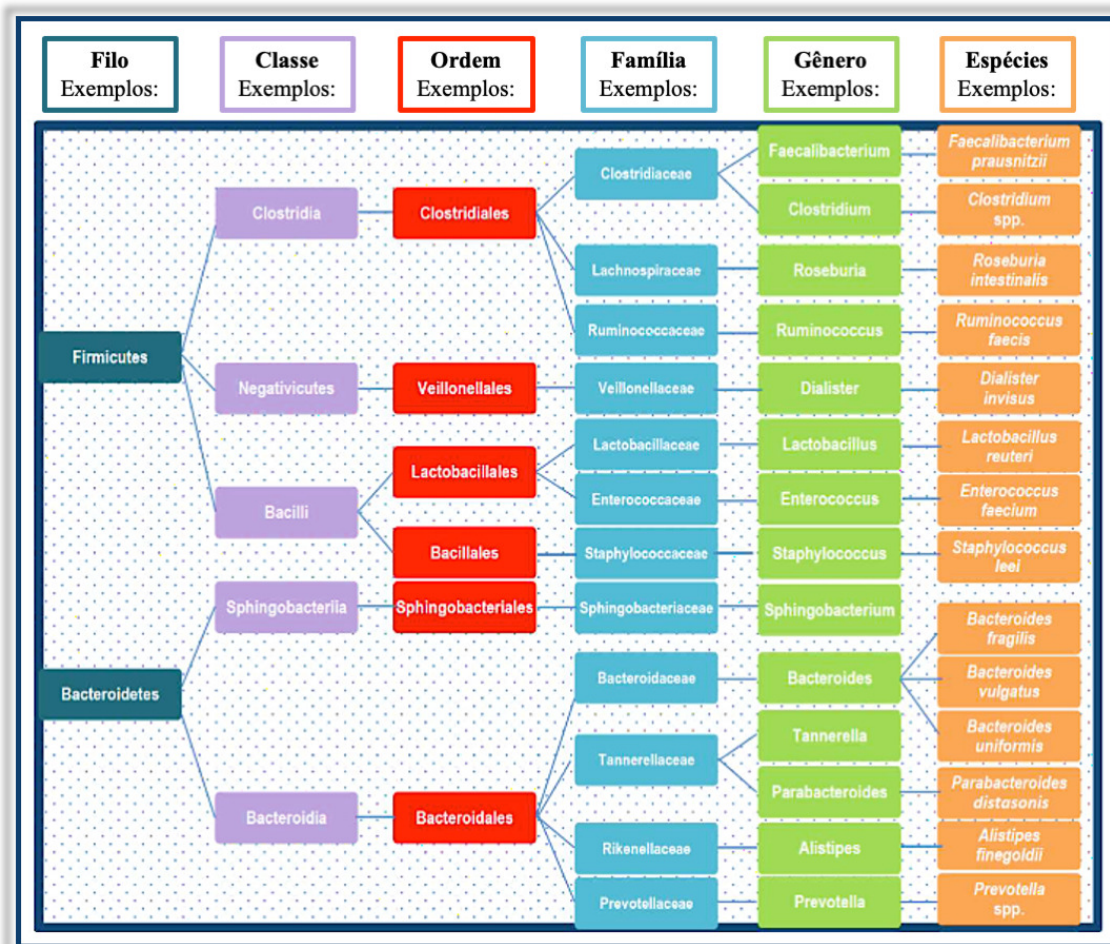
Taxonomia é o campo responsável por descrever, nomear e classificar organismos, sendo extremamente importante para o estudo da MI, pois distribui corretamente os microrganismos desse ambiente. As bactérias têm sua classificação taxonômica distribuída em filo, classe, ordem, família, gênero, espécie e subespécie (cepa). Essa classificação pode ser exemplificada para cepa de interesse (*L. fermentum*) como sendo: Filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*, gênero *Lactobacillus*, espécie *Lactobacillus fermentum*, subespécie *Lactobacillus fermentum* 296 (Garcia *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2015).

Cerca de 160 filos são encontrados, sendo alguns dominantes na MI, como os *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são os mais abundantes, compondo cerca de 90% da população microbiana intestinal (Arumugam *et al.*, 2011). Em meio a estes, o filo *Firmicutes* é composto por mais de 200 gêneros diferentes, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*. Já o filo *Bacteroidetes* predomina

os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*. Em seguida, com abundância bem menor, temos o filo *Actinobacteria*, que é representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium*, conforme demonstrado na Figura 1 (Rinninella *et al.*, 2019).

A contagem de alguns grupos taxonômicos está associada com saúde e doença, como, por exemplo, na obesidade já foi demonstrada alta taxa de *Firmicutes*, pertencentes a família *Ruminococcaceae* e níveis baixos de *Bacteroidetes* pertencentes a família *Bacteroidaceae* (Riva, *et al.*, 2017). Por outro lado, a microbiota intestinal de mulheres com anorexia se mostrou com predomínio de *Enterobacteriaceae* e menor quantidade dos gêneros *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Clostridium* em comparação com mulheres saudáveis, isso nos mostra a importância do estudo da MI no combate a doenças (Borgo *et al.*, 2017).

Figura 1 – Modelo de classificação taxonômica da microbiota intestinal



Bactérias pertencentes aos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que representam 90% da microbiota intestinal

Fonte: Adaptado de Rinninella *et al.* (2019)

2.1.2 Mecanismos de defesa da microbiota intestinal

O corpo humano possui diversas barreiras e camadas intestinais para proteção da corrente sanguínea. Entre o lúmen e a camada externa de muco tem-se a primeira barreira, com maior abundância microbiana, com bactérias que exercem função de resistência a bactérias patogênicas. Em seguida, encontra-se a camada de muco, onde a mucina produz uma ação bactericida através de suas proteínas. Após isso, a parede do epitélio compõe mais uma barreira, onde a potência de junção dos enterócitos determina capacidade anti-inflamatória, já que quanto mais frouxa essa junção, maior a permeabilidade intestinal e maior presença de células inflamatórias através da translocação (Forbes *et al.*, 2019; Knight *et al.*, 2018).

Além destas, também existe mais uma barreira comandada pelas células imunes. Essas barreiras existem porque dentro da microbiota são encontradas espécies de microrganismos probióticos, que exercem função benéfica ao hospedeiro, mas também bactérias patogênicas, que atuam em detrimento da saúde do hospedeiro. Visando saúde, o ideal é que ocorra um equilíbrio (homeostase) entre estas espécies (Waitzberg *et al.*, 2021).

Por conter cerca de 70% da população de microrganismos do corpo, o desequilíbrio da composição, função e diversidade da população microbiana no intestino é bastante preocupante, causando alterações que podem estar associadas ao desenvolvimento de doenças, e esse desequilíbrio é conhecido como disbiose intestinal (Zoete; Flavell, 2013).

A disbiose intestinal pode se apresentar de formas variadas, sendo pela expansão dos patobiontes, os membros da microbiota que tem potencial patogênico ao hospedeiro, pela diversidade reduzida, já que é ideal uma microbiota diversificada ao máximo para sua melhor função, ou pela redução da população de bactérias benéficas, que são essenciais para o equilíbrio e combate aos patógenos (Petersen; Round, 2014).

O estado de disbiose compromete a integridade da barreira intestinal, causando uma disfunção e levando a translocação de lipopolisacarídeos (LPS), endotoxinas e outros componentes bacterianos na circulação, resultando em respostas inflamatórias que podem aumentar o risco cardiovascular, como a aterosclerose, associada a capacidade do LPS promover recrutamento de monócitos ao endotélio, que podem levar a formação de células espumosas (Lau *et al.*, 2017). Além disso, metabólitos derivados da microbiota,

como moléculas aterogênicas (em exemplo, colina e N-óxido de trimetilamina (TMAO) correlacionam a MI com doenças (Tang; Hazen, 2017).

A variedade de bactérias que habitam o intestino é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Já o potencial patogênico da microbiota pode ser determinado pela diminuição de bactérias com propriedades benéficas, como algumas do filo *Bacteroidetes*, junto da elevada proliferação de microrganismos com potencial patológico, como algumas do filo *Firmicutes* (Cavalcanti Neto *et al.*, 2018; Netto Candido; Bressan; Alfenas, 2018). Outro aspecto relevante está relacionado a diminuição da população de bactérias gram-positivas, junto do aumento de bactérias gram-negativas, combinação que contribui para o início de cascatas inflamatórias e consequente agressão à membrana epitelial (Robles-Vera *et al.*, 2017).

Por outro lado, a predominância de microrganismos potencialmente probióticos pode levar ao aumento de força das zonas de oclusão das células epiteliais intestinais, diminuindo a translocação de LPS e endotoxinas, além de diminuir atividade de enzimas endoteliais produtora de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentar os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de enzimas antioxidantes, o que protege a função endotelial. Junto a isso, a diminuição de LPS e de EROs ameniza a produção de citocinas anti-inflamatórias, atenuando o processo inflamatório (Hersoug; Møller; Loft, 2016; Toral *et al.*, 2014;).

Essas citocinas são importantes medidores da imunidade celular, podendo ser avaliadas em diversos fluidos biológicos, como soro, sangue, fezes, saliva, suor. E fornecem informações importantes para o entendimento de diversas doenças. Em geral são classificadas em pró-inflamatórias, que são responsáveis por facilitar a inflamação e incluem as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α e anti-inflamatórias como as IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 que vão combater a inflamação (Liu *et al.*, 2021).

2.2 PROBIÓTICOS

O primeiro relato de tratamento em MI foi descrito na antiga China, onde fezes humanas foram usadas para tratar infecções e contaminações alimentares, mas apenas por volta de 1905 foi que cientificamente os probióticos passaram a ser vistos como benéficos, quando o pesquisador Metchnikoff propôs que a longevidade da população búlgara se dava pela presença de bactérias presente no iogurte popular da região (Wieërs *et al.*, 2020).

Nos últimos anos a literatura com essa temática foi potencializada, ampliando o conhecimento dos antes descritos como substâncias produzidas por bactérias que promove o crescimento de outra bactéria. Atualmente os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill *et al.*, 2014).

No Brasil, a regulamentação dos probióticos está descrito na Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, a qual dispõe sobre regras em relação a liberação do uso de probióticos (Brasil, 2018).

Atualmente, a população brasileira já dispõe de ampla oferta de produtos contendo probióticos, seja de forma isolada ou em combinados de cepas bacterianas, que também podem ser comercializados como simbióticos, ou adicionados em vitaminas, minerais, podendo ser incorporados em alimentos. Estes se diferenciam nas quantidades de Unidade Formadoras de Colônia (UFC), na forma farmacêutica e com apresentações variadas, o que permite a prescrição de acordo com a necessidade e adesão do paciente (Brasil, 2019).

2.2.1 Fatores que influenciam os efeitos do uso de probióticos

Diversos fatores são responsáveis por alterar a composição da MI, dentre eles destaca-se a dieta, especialmente em torno da qualidade de gorduras e quantidade de fibras ingeridas que podem impactar diretamente na composição da microbiota. Nesse contexto, existe uma relação de efeito mútuo, ou seja, afetando a composição microbiana a partir da ingestão de alimentos, como também, uma microbiota saudável pode gerar impacto no aproveitamento de cada nutriente (Chassaing *et al.*, 2015; Xu; Knight, 2015).

A fermentação de carboidratos acontece no colón, e alguns carboidratos não digeríveis podem ser fermentados e convertidos em Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) conferindo efeitos positivos à saúde do hospedeiro. Já a fermentação de proteína pode gerar aminoácidos de cadeia ramificada e alguns metabólitos que podem ser tóxicos. Algumas bactérias podem ativar hidrolase de ácidos biliares, mostrando também a contribuição no metabolismo lipídico (Morrison; Preston, 2016; Windey *et al.*, 2012).

O sexo biológico é um fator de grande importância que pode afetar a composição microbiana. Em estudo que investigou microrganismos e concentração de testosterona em homens e mulheres, observou-se que ambos os sexos em altos níveis de testosterona (relativo à referência de cada sexo), tiveram uma maior diversidade na microbiota

intestinal (Shin *et al.*, 2019). A testosterona se mostrou capaz de inibir efeitos da proliferação de células T em homens, e contrário ao estradiol a testosterona não altera a barreira intestinal (Gomez; Luckey; Taneja, 2015).

Desordens metabólicas como a síndrome do ovário policístico se associam com distúrbios da microbiota intestinal (ZHENG *et al.*, 2020). Em modelo animal já foi observado que machos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram abundância de *Lactobacillus*, *Alistipes*, *Lachnospiraceae* e *Clostridium*, já as fêmeas não são impactadas da mesma forma (Bolnick *et al.*, 2014).

Na população italiana, foi observado uma abundância de gêneros do filo *Bifidobacterium* nas mulheres (Borgo *et al.*, 2018). Na Espanha foi visto uma redução de *Bacteroides* nas mulheres em relação aos homens (Haro *et al.*, 2016). *Ruminococcus* se mostrou mais abundante em amostras fecais de mulheres quando comparado a homens, na China (Gao *et al.*, 2018). Em estudo realizado com população da Ucrânia, foi visto que indivíduos saudáveis apresentaram diferenças entre o grupo de homens e mulheres, com o grupo feminino possuindo maior presença dos filós *Firmicutes* e *Actinobacteria*, além de reduzida quantidade de *Bacteroidetes* em relação ao grupo masculino (Koliada *et al.*, 2021). Outro estudo com população do Japão, foi observado elevada quantidade dos gêneros *Prevotella*, *Megamonas*, *Fusobacterium* e *Megasphaera* em homens, e *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Akkermansia* nas amostras fecais de mulheres (Takagi *et al.*, 2019).

Os efeitos e funções dos probióticos são diversificados, e determinados pelos tipos de gêneros, espécies e cepas usadas, no qual cada cepa tende a conferir um benefício específico, como, por exemplo, melhora de pressão arterial ou melhora de controle glicêmico (Bashiardes *et al.*, 2017).

Diante dessa variedade de efeitos, alguns fatores ainda não são padronizados no estudo de probióticos. Não existe dosagem padrão para probióticos, e a partir disso diversas doses de tratamento vêm sendo propostas, e a depender da cepa pode-se ter um efeito melhor com doses maiores ou menores, dentre as analisadas (Ouwehand, 2017). Com *Lactobacillus sakei* CJS03, o uso de dose mais alta mostrou melhor efeito do que a dose mais baixa na melhora dos níveis de colesterol e triglicérido (Yosep *et al.*, 2019). Em estudo com *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 foi apresentado um efeito regulador de inflamação a partir da dose, e com dose alta foi possível observar um efeito pró-inflamatório mais forte (Everard *et al.*, 2011).

Outra importante discussão na pesquisa sobre probióticos e microbiota intestinal refere-se ao uso de cepas isoladas ou a combinação de múltiplas cepas com potencial de ação probiótica. Isso porque, teoricamente, o uso de fórmulas com mais de uma cepa pode ser mais proveitoso, em uma MI complexa, que contém diversos tipos de espécies para interação. Assim o uso combinado poderia ter efeito mais amplo em todas as espécies em relação ao uso de cepa individual. Além disso, podem ser observados efeitos sinérgicos na atuação da mistura, onde uma cepa impulsiona o potencial de ação da outra e a combinação dos efeitos aumenta a efetividade para resolução dos problemas (Macfarland, 2021).

2.3 *Limosilactobacillus fermentum*

A maioria dos estudos com probióticos se dá com o uso de bactérias produtora de ácido láctico. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* se destacam dentro da literatura de uso de probiótico como os mais amplamente utilizados (Azad *et al.*, 2018; Champagne *et al.*, 2011). *Lactobacillus* é um gênero que comporta mais de 200 espécies, e se caracteriza por altíssimo nível de diversidade filogenética e metabólica. Se caracteriza como gram-positiva, com forma de bastonete ou cocos, heterofermentativa, e anaeróbica ou aerotolerante (Duar *et al.*, 2017).

Uma das espécies de *Lactobacillus*, a *Lactobacillus Fermentum* é considerada segura e é amplamente utilizada em terapias e estudos com probióticos, ela é facilmente encontrada em diversos alimentos, fezes e microbiota vaginal. Recentemente, a *Lactobacillus fermentum* foi reclassificada taxonomicamente, e é agora denominada *Limosilactobacillus fermentum*, devido a característica de produzir exopolissacarídeos da sacarose, conferindo viscosidade (*smily; smily lactobacillus*) (Zheng *et al.*, 2020).

A partir de as suas características, o *L. fermentum* vem ganhando destaque no tratamento de doenças metabólicas. Cepas dessa espécie já apresentaram efeitos na manutenção dos níveis de GLP-1 (*Glucagon-like Peptide-1*) um hormônio que estimula a proliferação, previne apoptose das células beta pancreáticas, e assim melhora a síntese de insulina, promovendo um bom controle de glicemia e saciedade, as cepas também apresentaram redução da glicação que está relacionada a com degeneração muscular, prejuízo do vaso endotelial, fibrose hepática e insuficiência renal e as cepas são capazes de reduzir estresse oxidativo pelo aumento da produção de ácido ferúlico, um forte

antioxidante que reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (Aziz; Zaidi; Tariq, 2022; Feng; Wang, 2020; Kim; Lee; Kang, 2022; Nascimento *et al.*, 2022;).

2.3.1 Evolução do mix composto por *L. fermentum* 139, 263, 296

A origem dos estudos com o mix probiótico utilizado no presente trabalho surgiu a partir de estudos *in vitro*, onde as cepas potencialmente probióticas foram isoladas de subprodutos (cascas, sementes) do processamento de polpas de frutas, como abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.), acerola (*Malpighia glabra* L.), manga (*Mangifera indica* L.), morango (*Fragaria vesca* L.) e graviola (*Annona muricata* L.). Um total de 50 bactérias ácido lácticas, foram isoladas e identificadas com o gênero *Lactobacillus* sendo predominante e a espécie *L. Fermentum* seguido de *L. plantarum*, *L. nagelii*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. casei* (Garcia *et al.*, 2016).

Do total de cepas do estudo anterior, apenas nove foram avaliadas quanto ao potencial biotecnológico (a saber: *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, e *L. fermentum* 60 - subprodutos de acerola; *L. Paracasei* 106 - subprodutos da graviola; *L. fermentum* 139 e *L. fermentum* 141 - subprodutos da manga; *L. fermentum* 250 e *L. fermentum* 263 - subprodutos do abacaxi; e *L. fermentum* 296 - subprodutos do morango). Os testes incluíram propriedades de segurança (susceptibilidade a antibióticos, atividade hemolítica, degradação de mucina), funcionalidade fisiológica (tolerância a ácidos e sais biliares, desconjugação de sais biliares, hidrofobicidade da superfície celular, autoagregação e coagregação com *L. monocytogenes* e *E. coli*, atividade antagonista a patógenos e exposição a condições de trato gastrointestinal simulado) e propriedades tecnológicas (atividade proteolítica e lipolítica, tolerância a NaCl e produção de exopolissacaródeo e de diacetil). Nos resultados as cepas *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 mostraram uma melhor performance, com propriedades probióticas e indicação para estudos *in vivo* (Albuquerque *et al.*, 2017).

O primeiro estudo em modelos animais com estas cepas foi conduzido por Cavalcante *et al.*, (2019), em que analisaram apenas a cepa *L. fermentum* 296 de forma isolada, utilizando ratos *Wistar* machos adultos que foram expostos a uma dieta alta em gordura para indução a dislipidemia, e com a intervenção terapêutica sendo a suplementação de 1×10^9 UFC/mL da cepa *L. fermentum* 296. O impacto na saúde cardiovascular foi avaliado e após a intervenção de 4 semanas com a cepa foram

observadas melhorias em parâmetros cardiometabólicos, devido as reduções de colesterol total, LDL colesterol, triglicerídeos, do tônus simpático e da pressão arterial sistólica.

Em estudo subsequente do mesmo grupo, Oliveira *et al.* (2020) utilizaram a prole de machos filhotes de mães com dislipidemia, essa exposição ao ambiente dislipidêmico durante sua gestação e lactação é causadora de distúrbios metabólicos da prole. A partir desse cenário foi realizada a intervenção com a combinação da cepa *L. fermentum* 296 com as *L. fermentum* 139 e *L. fermentum* 263, onde foi visto que o conjunto apresentou o mesmo efeito do estudo anterior, com o incremento da redução de pressão arterial média e malondialdeído sérico (marcador de estresse oxidativo), que no anteriormente com a cepa isolada não foi possível ser observado, sugerindo que o uso do mix probiótico pode ter um efeito potencializado em relação ao uso individual.

Em outro estudo, Nascimento *et al.* (2022) utilizaram ratos *Wistar* machos jovens, também provenientes de mães dislipidêmicas, sendo esses tratados com dose de 10^9 UFC/mL do mix de *L. fermentum* 2 vezes ao dia, todo dia por 4 semanas após atingir a fase adulta. Neste foi visto que houve redução de pressão arterial sistólica, diastólica e média, e amenizou a disfunção renal e o estresse oxidativo pela via intestino-rins.

Na sequência, foram realizados dois estudos com o mesmo desenho experimental, entretanto diferindo no sexo avaliado. No primeiro estudo, utilizaram ratos *Wistar* machos adultos, que foram alimentados com dieta hiperlipídica juntamente com dose diária de 10^9 UFC/mL do mix de *L. fermentum*, 2 vezes ao dia, durante 4 semanas. Como resultados, a intervenção probiótica foi capaz de modular parâmetros metabólicos e inflamatórios como redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL colesterol, IL1 β , como também modulou positivamente marcadores de estresse oxidativo no cólon e no coração (Freire *et al.* 2021a).

No outro estudo, conduzido com fêmeas, foram observados resultados semelhantes como alterações nos níveis de glicose, perfil lipídico e parâmetros inflamatórios. Em contrapartida, foi observado mudanças nos marcadores de estresse oxidativo nos tecidos do cólon, fígado, coração e rins, além de um aumento dos níveis de AGCC nas fezes. Em conjunto, apesar das diferenças entre os achados dos estudos, as cepas se mostraram capazes de promover efeitos benéficos em parâmetros cardiometabólicos em ambos os sexos (Freire *et al.* 2021b).

Dando continuidade, em único estudo dessa linha com análise de composição microbiana, Ferreira *et al.* (2022) utilizaram ratos *Wistar* machos adultos, alimentados com dieta hiperlipídica juntamente com 10^9 UFC/mL do mix de *L. fermentum*, 1 vez ao

dia, durante 4 semanas, de forma geral foi observado que houve redução de pressão arterial, tônus simpático, resistência à insulina e dislipidemia, além de melhora da composição microbiana.

Alguns detalhes dos efeitos na composição microbiana chamam atenção no estudo de Ferreira *et al.* (2022), como por exemplo a redução da abundância relativa de *Ruminococcus torques* e *Ruminococcus gnavus*, que quando estão elevados são relacionados com fatores pró-inflamatórios, queda de diversidade microbiana, e relação com doença arterial coronariana. Houve também redução dos níveis de *Collinsella*, que estão associados com os níveis de resistência a insulina e dislipidemia quando em alto volume. Outro fator observado é sobre produção de AGCC, que em condições de estresse a intervenção do mix foi capaz de reduzir o prejuízo causado pela dieta hiperlipídica. O artigo também traz a reflexão sobre os níveis do gênero *Lactobacillus*, que embora o mix seja pertencente a ele e tenha apresentado inúmeros benefícios, a intervenção probiótica não foi capaz de melhorar os níveis de *Lactobacillus* afetados pela dieta hiperlipídica.

Todos os estudos anteriores *in vivo* testaram e conferiram a efetividade do mix probiótico, mas sempre padronizando a dose de 10^9 UFC/mL de cada cepa. Porém duas dúvidas surgiram diante da intenção de levar o probiótico para uso em humanos, a primeira foi sobre a existência de doses diferentes mais efetivas e outra foi sobre possíveis danos à saúde que essas doses poderiam causar.

E no estudo mais recente sobre a temática as dúvidas foram respondidas, Cruz Neto *et al.*, (2023) utilizaram ratos *Wistar* machos e fêmeas, que foram diariamente submetidos a administração do mix de *L. fermentum* em doses de 10^8 e 10^{10} UFC/mL, para testar a segurança de uso oral e toxicidade do probiótico diante das doses propostas. Assim como anteriormente foi visto *in vitro* sua segurança para uso animal, o resultado *in vivo* foi positivo para segurança do uso do mix probiótico nas doses propostas, elevando o potencial para um estudo clínico futuro. Na tabela 1 podemos observar o compilado dos estudos *in vivo* com esse mix probiótico.

Tabela 1 – Estudos in vivo sobre os efeitos do uso do mix probiótico de *Limosilactobacillus fermentum*

Autores	Composto	Principais achados
De Oliveira <i>et al.</i> (2020)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Reduções de malondialdeído sérico, colesterol total, LDL colesterol, triglicerídeos, do tônus simpático e da pressão arterial sistólica e média.
De Luna Freire <i>et al.</i> (2021a)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Redução de níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL colesterol, IL1 β (citocina pró-inflamatória), como também redução da inflamação sistêmica e marcadores de estresse oxidativo no cólon e no coração.
De Luna Freire <i>et al.</i> (2021b)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Aumento dos níveis fecais de AGCC, reduzindo glicemia, parâmetros dislipidêmicos, inflamação sistêmica de baixo grau e estresse oxidativo na mucosa do colón, fígado, coração e rins.
Ferreira <i>et al.</i> (2022)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Redução de pressão arterial, tônus simpático, resistência à insulina e dislipidemia, além de melhoria da composição da microbiota intestinal.
Nascimento <i>et al.</i> (2022)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Redução de pressão arterial sistólica, diastólica e média, e redução da disfunção renal e do estresse oxidativo pela via intestino-rins.
Cruz Neto <i>et al.</i> , (2023)	<i>L.f</i> 139, 263 e 296	Confirmação de segurança no uso do mix probiótico em dosagens mais alta e mais baixa em relação aos estudos prévios.

LDL colesterol (*Low density lipoprotein* - lipoproteína de baixa densidade); *L.f* (*Limosilactobacillus fermentum*); IL1 β (Interleucina 1 beta); AGCC (ácidos graxos de cadeia curta).

Fonte: Autor (2023).

3 METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E LOCAL DA PESQUISA

Trata-se de um ensaio pré-clínico que avaliou os efeitos de diferentes doses de um mix probiótico composto de *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 sobre a microbiota intestinal de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) macho e fêmea.

Os animais foram alocados no Laboratório de Experimentação Animal (LANEX), do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Com as cepas *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Nutrição da UFPB.

3.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal da Paraíba sob o número de protocolo 1871160322 e seguiu as recomendações do Conselho Nacional para Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e dos Princípios Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais.

Foram utilizados 30 ratos, sendo 15 machos e 15 fêmeas, com 70 dias de vida. Todos os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno, com água filtrada e ração padrão de laboratório com distribuição *ad libitum* (Labina®, Purina Aribands) durante todo o período de experimento, mantidos em ciclo claro escuro de 12h, com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($55 \pm 10\%$).

3.3 PREPARAÇÃO DO MIX PROBIÓTICO DE *L. fermentum*

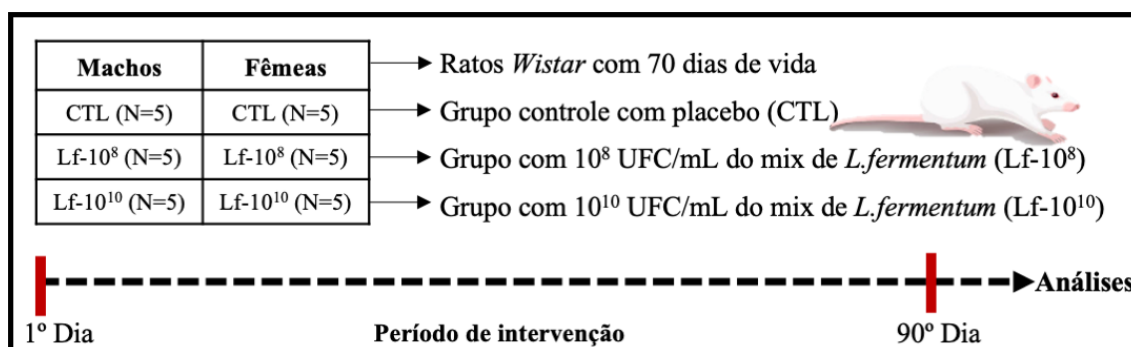
Para obtenção da suspensão de células cada cepa foi cultivada anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) em caldo Mann, Rogosa & Sharpe (MRS) (Himedia, Mumbai, Índia) a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 20-24 horas. As células testadas foram coletadas por centrifugação ($8.000\text{ g}/10\text{min}/4^\circ\text{C}$), lavadas duas vezes com solução PBS estéril, ressuspensas e homogeneizadas usando um vortex (30 segundos) para obter suspensões celulares padrão com densidade óptica (OD) leitura a 625 nm (OD 660) de 1,2 e 2,0, correspondendo a contagens de células viáveis de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e 10^{10} UFC/mL,

respectivamente, quando semeadas em ágar MRS ($37 \pm 0,5$ °C por 20-24 horas). As suspensões celulares mistas foram obtidas na proporção de 1:1:1 (v/v).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Ao longo de 90 dias consecutivos de experimento foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas para formar três grupos randomizados em grupo controle com administração de 1 mL de PBS, como placebo (CTL, n = 5 por sexo), grupo com administração de 10^8 UFC/mL do mix de *L. fermentum* (Lf- 10^8 , n = 5 por sexo) e grupo com administração de 10^{10} UFC/mL do mix de *L. fermentum* (Lf- 10^{10} , n = 5 por sexo), totalizando 10 ratos por grupo (5 machos e 5 fêmeas), com administração pela via oral, através de gavagem.

Figura 2 – Esquema representativo do desenho experimental do estudo



Fonte: Autor (2023).

3.5 EUTANÁSIA E COLETA DOS MATERIAIS

Ao término da intervenção, os animais foram anestesiados com pentobarbital (5 mg/Kg, ip) combinado com lidocaína (10 mg/kg) e passaram por eutanásia, por decapitação. As cavidades abdominais e torácicas foram examinadas quanto a presença de lesões e tumores. Foram coletados sangue e fezes, após isso foram armazenados no freezer -80°C até o início das análises posteriores. As carcaças dos animais foram inicialmente acondicionadas em saco branco leitoso, identificadas como animal para descarte e alocadas em freezer -20°C próprios para o descarte e posteriormente encaminhados para tratamento térmico por incineração por empresa especializada (BRASIL, 2004).

3.6 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

As amostras fecais foram enviadas para análise e o preparo seguiu um protocolo da empresa responsável (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). A diversidade bacteriana foi realizada através do sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. Os dados foram sequenciados utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), kits com 300 ciclos foram utilizados (sequenciamento por paired-end). O sequenciamento foi agrupado a partir de uma classificação taxonômica de acordo com banco de dados exposto na literatura (Quast *et al.*, 2013).

3.7 MEDIÇÃO 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). O teste foi realizado 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 dos limites de detecção do ensaio foram registradas como zero, enquanto as amostras acima do valor limite mais alto da quantificação da curva padrão foram atribuídas ao valor mais alto da curva. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Infinite[®] F50 Plus, Tecan Trading AG, Suíça).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade dos dados. A significância estatística foi avaliada pelo teste de variância ANOVA two-way utilizando-se de doses (Lf-10⁸ e Lf-10¹⁰) e sexo (masculino e feminino). Com Bonferroni's como teste post-hoc. Pearson foi utilizado como teste de correlação. Os resultados das comparações foram considerados significativos apenas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo original apresentado no apêndice A.

O artigo apresentado no apêndice A intitulado como “*A mix of potentially probiotic Limosilactobacillus fermentum strains alters gut microbiota in a dose- and sex-dependent manner in Wistar rats*” avaliou a resposta da microbiota intestinal em ratos *Wistar* machos e fêmeas após tratamento com diferentes doses de um mix probiótico composto por *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296. A dose de 10^8 UFC/mL do mix foi capaz de reduzir a abundância relativa de *Bifidobacteriaceae* e *Anaerobiospirillum*, e aumentar a abundância de *Lactobacillus* e *Turicibacter* nas fêmeas, já nos machos foi capaz de reduzir o ratio F/B e aumentar a abundância de *Anaerobiospirillum* e *Turicibacter*. A dose de 10^{10} UFC/mL do mix também foi capaz de reduzir a abundância relativa de *Bifidobacteriaceae* e aumentar a abundância relativa de *Desulfovibrionaceae*, *Prevotella* e *Turicibacter* nas fêmeas, já nos machos também foi capaz de reduzir o ratio F/B, e aumentar a abundância de *Lachnospiraceae*, *Prevotella* e *Turicibacter*.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 704-716, 2017.

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

AZAD, M. A. K. *et al.* Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed research international**, [s.l.], p. 1-9, 2018.

AZIZ, G.; ZAIDI, A.; TARIQ, M. Compositional Quality and Possible Gastrointestinal Performance of Marketed Probiotic Supplements. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 288-312, 2022.

BARKHIDARIAN, B. *et al.* Probiotic Supplementation and Micronutrient Status in Healthy Subjects: A Systematic Review of Clinical Trials. **Nutrients**, [s.l.], v. 13, n. 9, 3001, 2021.

BASHIARDES, S. *et al.* The microbiome in anti-cancer therapy. *In: Seminars in immunology*. Academic Press, 2017. p. 74-81.

BOLNICK, D. I. *et al.* Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. **Nature communications**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 4500, 2014.

BORGO, F. *et al.* Body mass index and sex affect diverse microbial niches within the gut. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 213, 2018.

BORGO, F. *et al.* Microbiota in anorexia nervosa: the triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. **PloS one**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. e0179739, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. [S.l.]: ANVISA, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 243, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Brasília, DF: ANVISA, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917 Acesso em: 06 out. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 222, de 28 de março de 2018**. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Brasília, DF: ANVISA, 2018. Disponível em: <https://www.cff.org.br/userfiles/file/RDC%20ANVISA%20N%C2%BA%20222%20D>

E%2028032018%20REQUISITOS%20DE%20BOAS%20PR%3%81TICAS%20DE%20GERENCIAMENTO%20DOS%20RES%3%8DDUOS%20DE%20SERVI%3%87OS%20DE%20SA%3%9ADE.pdf Acesso em: 06 out. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 306, de 07 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, DF: ANVISA, 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html Acesso em: 06 out. 2023.

CANDIDO, T. L. N.; ALFENAS, R. C. G.; BRESSAN, J. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. **Nutricion hospitalaria**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 1432-1440, 2018.

CAVALCANTE, R. G. S. *et al.* The probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s.l.], v. 29, n. 12, p. 1408-1417, 2019.

CAVALCANTI NETO, M. P. *et al.* Gut microbiota and probiotics intervention: a potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease?. **Pharmacological research**, [s.l.], n. 130, p. 152-163, 2018.

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

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

CRUZ NETO, J. P. R. *et al.* Safety Evaluation of a Novel Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* in Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], p. 1-11, 2023.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. *et al.* Role of the microbiome in human development. **Gut**, [s.l.], v. 68, n. 6, p. 1108-1114, 2019.

DOMINIANNI, C. *et al.* Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. **PloS one**, [s.l.], v. 10, n. 4, 2015.

DUAR, R. M. *et al.* Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 27-48, 2017.

EVERARD, A. *et al.* Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. **Diabetes**, [s.l.], v. 60, n. 11, p. 2775-2786, 2011.

FENG, T.; WANG, J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1801944, 2020.

FENG, Q., CHEN, W. D., & WANG, Y. D. Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. **Frontiers in microbiology**, 9, 151, 2018.

FERREIRA, G. A. H. *et al.* Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], p. 1-11, 2022.

FORBES, J. D. *et al.* A fungal world: could the gut mycobiome be involved in neurological disease?. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 3249, 2019.

FREIRE, M. O. L. *et al.* Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Foods**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 2202, 2021.

FREIRE, M. O. L. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* Strains with Claimed Probiotic Properties Exert Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties and Prevent Cardiometabolic Disorder in Female Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], p. 1-13, 2021.

GAO X, Z. M., *et al.* Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific. **Front Microbiol**, [s.l.], v. 9, p. 1250, 2018.

GARCIA, E. F. *et al.* Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, p. 1371, 2016.

GOMEZ, A.; LUCKEY, D.; TANEJA, V. The gut microbiome in autoimmunity: sex matters. **Clinical immunology**, Orlando, v. 159, n. 2, p. 154-162, 2015.

HARO C, R. O. A. *et al.* Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. **PLoS One**, [s.l.], v. 11, e0154090, 2016.

HERSOUG, L. G.; MØLLER, P.; LOFT, S. Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. **Obesity reviews**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 297-312, 2016.

HILL, C. *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. **Gastroenterology & hepatology**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HILLS, R. D., Jr, Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C., & Theberge, C. R. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 1613, 2019.

INTEGRATIVE, H. M. P. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. **Cell host & microbe**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 276-289, 2014.

KIM, H. I. *et al.* IL-10 expression-inducing gut bacteria alleviate high-fat diet-induced obesity and hyperlipidemia in mice. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 599–603, 2020.

KIM, J. E.; LEE, J. Y.; KANG, C. *Limosilactobacillus fermentum* MG4295 Improves Hyperglycemia in High-Fat Diet-Induced Mice. **Foods**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 231, 2022.
KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 410-422, 2018.

KOLIADA, A. *et al.* Sex differences in the phylum-level human gut microbiota composition. **BMC microbiology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 1-9, 2021.

LIU, C. *et al.* Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced science**, [s.l.], v. 8, n. 15, e2004433, 2021.

LÓPEZ-MORENO, A. *et al.* Probiotic strains and intervention total doses for modulating obesity-related microbiota dysbiosis: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, [s.l.], v. 12, n. 7, p. 1921, 2020.

LOZUPONE, C. A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, [s.l.], v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.

MA, W. *et al.* Immunomodulatory effects of complex probiotics on the immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 14, 1055197, 2023.

MCFARLAND, L. V. Efficacy of single-strain probiotics versus multi-strain mixtures: systematic review of strain and disease specificity. **Digestive Diseases and Sciences**, [s.l.], v. 66, n. 3, p. 694-704, 2021.

MENG, Y. *et al.* *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 Ameliorates Impaired Intestinal Immunity and Metabolic Disorders in Cyclophosphamide-Treated Mice. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 731, 2019.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 189-200, 2016.

MOTEVASELI, E. *et al.* Investigation of antitumor effects of *Lactobacillus crispatus* in experimental model of breast cancer in BALB/c mice. **Immunotherapy**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 119–129, 2018.

NASCIMENTO, L. C. P. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum*, Current Evidence on the Antioxidant Properties and Opportunities to be Exploited as a Probiotic Microorganism. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], p. 1-20, 2022.

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

OUWEHAND A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial microbes**, [s.l.], v. 8, n. 2, 143–151, 2017.

PAONE, P.; CANI, P. D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?. **Gut**, [s.l.], v. 69, n. 12, p. 2232–2243, 2020.

PENNISI, E. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. **Science**, [s.l.], v. 337, p. 1159-1161, 2012.

PETERSEN, C.; ROUND, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 1024-1033, 2014.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Opens external link in new window. **Nucl. Acids Res.**, [s.l.], v. 41 p. 590-596, 2013.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

RIVA, A. *et al.* Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in *Firmicutes* populations. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 95-105, 2017.

ROBLES-VERA, I. *et al.* Antihypertensive effects of probiotics. **Current hypertension reports**, v. 19, p. 1-8, 2017.

SANDERS, M. E. *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 605-616, 2019.

SHI, C. W. *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Promotes Mouse Gut Microbiota Diversity and T Cell Differentiation. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 11, 607735, 2020.

SHIN, J. *et al.* Serum level of sex steroid hormone is associated with diversity and profiles of human gut microbiome. **Research in microbiology**, [s.l.], v. 170, n. 4-5, p. 192-201, 2019.

TAKAGI, T. *et al.* Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. **Journal of gastroenterology**, [s.l.], v. 54, p. 53-63, 2019.

TANG, W. H.; HAZEN, S. L. Microbiome, trimethylamine N-oxide, and cardiometabolic disease. **Translational research**, [s.l.], v. 179, p. 108-115, 2017.

TORAL, M. *et al.* The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. **Clinical Science**, London, v. 127, n. 1), p. 33-45, 2014.

WAITZBERG, D. L. **Microbiota gastrointestinal: da disbiose ao tratamento**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2021.

WIEËRS, G. *et al.* How probiotics affect the microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 454, 2020.

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

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

YOON, K.; KIM, N. Roles of sex hormones and gender in the gut microbiota. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 314-325, 2021.

YOSEP, J. I. *et al.* Dose-dependent and strain-dependent anti-obesity effects of *Lactobacillus sakei* in a diet induced obese murine model. **PeerJ**, [s.l.], v. 7, p. e6651, 2019.

YURKOVETSKIY, L. *et al.* Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. **Immunity**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 400–412, 2013.

ZHENG, J. *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**, [s.l.], v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHU, C. *et al.* Functional basis of microorganism classification. **PLoS computational biology**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. e1004472, 2015.

ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Interactions between nod-like receptors and intestinal bacteria. **Frontiers in immunology**, [s.l.], v. 4, p. 462, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO

Artigo submetido na Probiotics and Antimicrobial Proteins.

Fator de impacto: 5.265 Qualis nutrição: A3

A mix of potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains alters gut microbiota in a dose- and sex-dependent manner in Wistar rats

*Corresponding authors:

José Luiz de Brito Alves, PhD

Federal University of Paraíba, Department of Nutrition

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

CEP: 58051-900

Phone/fax: ++ 55 81 9 98455485

E-mail: jose.luiz@academico.ufpb.br

Abstract: Probiotics could improve host health conditions by modulating gut microbiota. *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, and 296 are potentially probiotic strains isolated from a byproduct of fruit processing, with reported immunomodulatory, antioxidant, and hypolipidemic properties. However, it is unclear whether *L. fermentum* 139, 263 and 296 modulates gut microbiota in a dose- and sex-specific manner. This study aimed to evaluate the gut microbiota composition of male and female Wistar rats after treatment with a mix of *L. fermentum* 139, 263, and 296 at different doses. Thirty Wistar rats (15 male and 15 female) were grouped into the control group (CTL), the group receiving *L. fermentum* at a dose of 10^8 CFU (Lf- 10^8), and a group receiving *L. fermentum* at a dose of 10^{10} CFU (Lf- 10^{10}) for 13 weeks. After 13 weeks, cytokine levels and gut microbiota composition were evaluated. Administration of *L. fermentum* did not change the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in female, but administration of Lf- 10^8 or Lf- 10^{10} significantly reduced the ratio in male rats. Results also demonstrated a change in the relative abundance of bacteria at phylum, family, and genus levels. The treatment with Lf- 10^{10} increased the alpha diversity of the gut microbiota of male rats.

Keywords: Probiotics; *Limosilactobacillus*; gut microbiota; dose-response; sex differences.

1 Introduction

The gut microbiota is an ecosystem formed by several living microorganisms inhabiting the enteric lumen and covering more than 1500 distinct species [1]. The phylum *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the most predominant in human gut microbiota, comprising up to 90% of the bacterial abundance, followed by *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobia* [2]. The composition, diversity, and function of gut microbiota can be altered by several factors, such as genetics, dietary patterns, age, antibiotic use, chronic diseases, and cardiovascular and inflammatory diseases [2-5]

The gut microbiota composition may be influenced by sex [6] and a study with diabetic mice showed that the abundance of *Porphyromonadaceae*, *Veillonellaceae*, *Kineosporiaceae*, *Peptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Cytophagaceae*, *Peptostreptococcaceae*, and *Bacteroidaceae* was higher in male when compared to female mice [7]. In humans, the relative abundance of *Bacteroidetes* is typically lower in female than in male individuals [8].

The administration of probiotics in adequate amounts could improve the composition, diversity, and function of the gut microbiota and promote host health benefits [9, 10], such as in the treatment of cardiometabolic, cancer, inflammatory, and immune diseases [11-15]. Although dose-response assessment had been recommended to assess the benefits of probiotics on host health, few studies have evaluated this gap and, to our better understanding, none have evaluated sex-specific effects in probiotic therapy [16-22].

Limosilactobacillus fermentum has been cited in a series of in vitro experiments as a safe lactic acid bacteria species and commonly reported as having widespread probiotic properties, such as normalization of perturbed gut microbiota, as well as species-level effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, and bile salt metabolism properties [23, 24]. Strains of *L. fermentum*, namely *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263, and *L. fermentum* 296, were isolated from fruit in Brazil and characterized as safe probiotic candidates using in vitro [23] and in vivo experiments [25]. Furthermore, administration of single or mixed *L. fermentum* strains in male and female rats fed a high-fat diet reduced dyslipidemia, inflammation, and oxidative stress [26-28]. However, it is unclear whether *L. fermentum* 139, 263 and 296 modulates gut microbiota in a dose- and sex-specific manner.

Therefore, this study aimed to evaluate the response of the gut microbiota in male and female Wistar rats after treatment with different doses of a potential probiotic mix with *L. fermentum* 139, 263, and 296.

2 Methodology

2.1 Animals and ethical aspects

Thirty Wistar rats (15 males and 15 females) were placed in polypropylene cages with filtered water and chow *ad libitum* (Labina, Purina Aribands) throughout the experiment, kept in a 12-h light-dark cycle, with temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and controlled humidity ($55 \pm 10\%$). This study was approved by the ethics committee in animal experimentation of the Federal University of Paraiba (CEUA/UFPB) under number 1871160322 and followed the recommendations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the International Principles for Biomedical Research Involving Animals.

2.2 Probiotic strains and reparation of cell suspension

The strains *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263, and *L. fermentum* 296 were gently provided by the Laboratory of Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba (João Pessoa, PB, Brazil). Each strain was cultured anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in Mann, Rogosa, & Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 20-24 h. To obtain the cell suspension, the cells were collected by centrifugation ($8,000 \times g$, 10 min, 4°C), washed twice with sterile PBS solution, resuspended in PBS solution, and homogenized using a vortex (30 s) to obtain standard cell suspensions with optical density (OD) reading at 625 nm (OD₆₂₅) of 1.2 and 2.0, corresponding to viable cell counts of approximately 10^8 colony forming units per milliliter (CFU/mL) and 10^{10} CFU/mL, respectively, when plated on MRS agar (HiMedia). Mixed cell suspensions were obtained in a 1:1:1 ratio (v/v).

2.3 Experimental design

Male and female rats were grouped into i) control group (CTL, n=5/sex), ii) *L. fermentum* receiving a dose of 10^8 CFU (Lf- 10^8 , n=5/sex), and iii) *L. fermentum* receiving a dose of 10^{10} CFU (Lf- 10^{10} , n=5/sex). The control group received PBS as a placebo vehicle. Placebo or *L. fermentum* was administered by oral gavage at a dose of 1mL for 90 days.

2.4 Measurement of cytokines

Cytokine levels in blood samples (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10) were determined using the Millipore 7-plex kit (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). The assay was performed in a 96-well plate with a filter membrane according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in the samples were estimated from a standard curve using a third-order polynomial equation and expressed in pg/mL. Samples below the limit of detection of the assay were recorded as zero, while samples above the highest quantification limit of the standard curve were assigned to the highest value on the curve. Reading was performed in a microplate reader.

2.5 DNA Extraction, 16S rRNA gene amplicon library preparation, and sequencing

The bacterial diversity was assessed via high-throughput sequencing of 16S rRNA V3/V4 region employing 341F (CCTACGGGRRSGCAGCA G) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers. The 16S rRNA libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) using the standard Illumina primers provided in the kit, 300 cycles (paired-end Sequencing with 200 bp). After sequencing, quality filters were applied to fastq files, including the removal of truncated and low-quality reads (Phred score < 20) using the Trimmomatic tool [29]. Then, sense and antisense paired reads were merged into contigs, and the singletons and chimeras were removed. The sequences were grouped into Taxonomic Operational Units (OTUs) using Uchime v. 4.2.40 and Vsearch v 2.22.1 [30, 31] (97% identity) and assigned taxonomically considering a 97% similarity alignment against sequences from the SILVA database [32].

2.6 Statistical analysis

Data were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The Shapiro-Wilk test was used to assess data normality. Statistical significance was evaluated using analysis of variance ANOVA two-way test with dose (10^8 and 10^{10} CFU) and sex (male and female) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. Pearson correlation test was used. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism® (version 6.01) and the significance was maintained at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Effects of *L. fermentum* 139, 263, and 296 administrations on microbiota composition.

The two most abundant bacterial phyla identified were *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, while *Proteobacteria* and *Actinobacteria* phyla were identified in lower abundance (**Figure 1A**). Female rats had a reduced *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio compared to male rats ($p < 0.05$). Administration of *L. fermentum* did not change the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in females, but significantly reduced the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in male rats ($p < 0.05$) (**Figure 1B**).

3.2 Effects of *L. fermentum* 139, 263, and 296 administrations on the relative abundance and significant difference at the family level

The top twenty families identified were f_*Clostridiaceae*, f_*Selenomonadaceae*, f_*Sutterellaceae*, f_*Bifidobacteriaceae*, f_*Bacteroidaceae*, f_*Desulfovibrionaceae*, f_*Enterobacteriaceae*, f_*Eubacteriaceae*, f_*Prevotellaceae*, f_*Erysipelotrichaceae*, f_*Lactobacillaceae*, f_*Helicobacteraceae*, f_*Succinivibrionaceae*, f_*Ruminococcaceae*, f_*Lachnospiraceae*, f_*Tannerellaceae*, f_*Acidaminococcaceae*, f_*Streptococcaceae*, f_*Eggerthellaceae*, and f_*Corlobacteriaceae* (**Figure 2**).

Among the twenty families identified, the relative abundances of *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Desulfovibrionaceae* were similar between male and female rats (**Figures 3A, D, and E**). On the other hand, female rats had a higher abundance of *Bifidobacteriaceae* and a lower abundance of *Sutterellaceae* compared to male rats ($p < 0.05$, **Figure 3B and C**). Administration of Lf-10⁸ or Lf-10¹⁰ did not alter the abundance of *Lactobacillaceae* and *Sutterellaceae* in male and female rats ($p > 0.05$, **Figure 3A and C**). Administration of Lf-10⁸ or Lf-10¹⁰ reduced the abundance of *Bifidobacteriaceae* in female rats but not in male rats (**Figure 3 B**). Administration of Lf-10¹⁰ increased the abundance of *Desulfovibrionaceae* in female rats ($p < 0.05$) but not in male rats (**Figure 3D**). Lastly, administration of Lf-10¹⁰ increased the abundance of *Lachnospiraceae* in male rats but not in female rats ($p < 0.05$, **Figure 3E**).

3.3 Correlation between the relative abundance of families and inflammatory cytokines

A correlation analysis was performed between the relative abundance of *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* and the levels of inflammatory cytokines. The correlation analysis showed that the higher the relative abundance of *Lachnospiraceae* the lower the IL-1 β levels ($r=0.44$, $p=0.01$, **Figure 4A**). There was no correlation between the abundance of *Lachnospiraceae* and TNF- α (**Figure 4B**), IL-6 (**Figure 4C**) and IL-10 levels (**Figure 4D**).

The increased relative abundance of *Lactobacillaceae* correlated positively with increased IL-10 concentrations ($r=0.39$, $p=0.03$, **Figure 4H**). There was no correlation between the abundance of *Lactobacillaceae* and the levels of the other measured cytokines (**Figure 4E – 4F – 4G**).

3.4 Changes in relative abundance at the gender level

Twenty genera were identified in the feces of the CTL, Lf-10⁸ and Lf-10¹⁰ groups of male and female rats (**Figures 5A and 5B**), namely, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Turicibacter*, *Allobaculum*, *Lactobacillus*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Prevotella*, *Anaerobiospirillum*, *Mucispirillum*, *Treponema*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *ParaBacteroides*, *Helicobacter*, and *Eubacterium*.

The genera *Lactobacillus*, *Prevotella*, and *Anaerobiospirillum* showed higher relative abundance in female and male rats (**Figure 5A**). Regarding the dose-response, it was observed in female rats that the genus *Lactobacillus* had greater relative abundance in the Lf-10⁸ group when compared to the CTL and Lf-10¹⁰ groups (**Figure 5B**). On the other hand, in male rats, the Lf-10⁸ and Lf-10¹⁰ groups had a lower relative abundance of the genus *Lactobacillus* when compared to the CTL group (**Figure 5A**). The genus *Turicibacter* had lower relative abundance in both male and female rats than in the CTL group regardless of the administered doses (**Figures 5A and 5B**).

3.5 Effects of treatment with *L. fermentum* 139, 263, 296 in the alpha diversity

Alpha diversity was assessed in the feces of male and female rats using the Shannon index (**Figures 6A and 6B**). In female rats, no significant changes in alpha diversity were observed in the CTL, Lf-10⁸, and Lf-10¹⁰ groups (**Figure 6A**). However, in male rats (**Figure 6B**), Lf-10¹⁰ group had a greater alpha diversity when compared to the control group ($p < 0.05$).

4 Discussion

This study showed changes in the gut microbiota composition of male and female *Wistar* rats after treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 at different doses for thirteen weeks. The results demonstrated that treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 changed the relative abundance of bacteria at phylum, family, and genus levels. The relative abundance of *Lachnospiraceae* was negatively associated with serum IL1 β levels, while the relative abundance of *Lactobacillaceae* was positively associated with serum IL-10 levels. It has been suggested that gut microbiota composition is sex-dependent [33] and it could respond in different forms to probiotic treatment [34, 35], as well as that lactobacilli can change the population of microorganisms forming the gut microbiota and control the functioning of the gut microbiota ecosystem [10].

The most abundant bacterial phyla in the healthy gut microbiota are represented by *Firmicutes* and *Bacteroidetes* [36]. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio has been used as a potential biomarker of obesity and associated disorders [37]. Increased *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio has been reported in several diseases, such as obesity, diabetes mellitus, inflammatory bowel disease, and cardiovascular disease [38-40]. On the other hand, a low *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio has been associated with lean phenotype, younger age, cardiovascular health, and a balanced immune system [37]. The treatment with Lf-10⁸ or Lf-10¹⁰ decreased the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in male rats compared to the CTL group, while no change was found in female rats. These results indicate that treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 can positively modulate the gut microbiota composition at the phyla level.

Lactobacillaceae was the family with the highest relative abundance in the gut microbiota of *Wistar* rats. The *Lactobacillaceae* family can be found at different environments, such as the gastrointestinal tract, urinary, and genital systems [41]. Although the treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 did not alter the relative abundance of *Lactobacillaceae* in male and female rats, many *Lactobacillus* species are used as probiotics due to strain-specific properties, such as lower cholesterol activity, immunomodulatory effects, and antioxidant properties [38-44].

Lachnospiraceae is a family of anaerobic bacteria in the *Clostridiales* order within the *Firmicutes* phylum and are obligate members of the gut microbiota in healthy humans [45]. An increased abundance of short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacteria belonging

to the *Lachnospiraceae* family has been reported in subjects fed a high-fiber diet or omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) treatment, being associated with host health benefits [46]. On the other hand, gut microbiota enriched with *Lachnospiraceae* has been reported in patients with chronic and inflammatory diseases [47]. The treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 increased the relative abundance of *Lachnospiraceae* in male rats receiving Lf-10¹⁰ when compared to the CTL group. However, the treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 did not change the relative abundance of *Lachnospiraceae* in female rats. The reason for this is not explained and reinforces the idea that probiotic therapy can have a sex effect on gut microbiota.

Bifidobacteriaceae are a family of bacteria with fermentative metabolism, inhabiting human and animal gastrointestinal tract [48]. Recent meta-analyses suggest that high populations of *Bifidobacteriaceae* may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease [49], while a systematic review indicated a higher abundance of *Bifidobacteriaceae* in individuals with depression [50]. Our results showed a decrease in the relative abundance of *Bifidobacteriaceae* in male rats when compared with female rats. Additionally, the treatment with Lf-10⁸ and Lf-10¹⁰ in female rats decreased the relative abundance of *Bifidobacteriaceae* when compared to the CTL group.

A preclinical study demonstrated that beef-based cooked mince and sucrose consumption stimulated an outgrowth of the family of *Desulfovibrionaceae* in the colonic microbiome, which was associated with oxidative stress and cardiac hypertrophy [51]. Additionally, high-fat diet consumption increased the relative abundance of *Desulfovibrionaceae* in mice [52]. Curiously, the administration of Lf-10¹⁰ increased the relative abundance of the *Desulfovibrionaceae* family in female rats when compared with the dose of 10⁸ CFU/mL and CTL group, although no difference was found when compared to male rats.

It has been shown that the relative abundance of *Sutterellaceae* was increased in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome [53]. In the present study, the relative abundance of *Sutterellaceae* was lower in male rats when compared with female rats. Further studies may be performed to determine whether women have a higher risk of developing irritable bowel syndrome. The administration of *L. fermentum* did not alter the relative abundance of *Sutterellaceae* in both sexes. However, it has been demonstrated that oats, a soluble fiber used as a prebiotic, decreased the relative abundance of *Sutterellaceae* in a

Chinese population with mild hypercholesterolemia [54]. In addition, the abundance of *Sutterellaceae* was negatively correlated with quercetin concentration in healthy elderly human subjects [55]. In this way, our research group has developed a novel nutraceutical product containing prebiotic, polyphenols, and *L. fermentum* strains [56,57], and further studies will be conducted to understand their effects on gut microbiota composition in health and disease.

Physiologically, the gut microbiota is directly linked to the immune system in maintaining homeostasis in the host gut. In this study, a correlation analysis was performed between the relative abundance of *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* and the levels of inflammatory cytokines. The results showed that the higher the relative abundance of *Lachnospiraceae*, the lower the levels of IL-1 β and that the relative abundance of *Lactobacillaceae* was positively correlated with IL-10 levels.

The health-promoting effects of members of the *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* families have been described in the literature, including the production of SCFA, the conversion of primary bile acids into secondary bile acids, and the protection of the intestinal barrier by resisting the colonization of drug-resistant pathogens [45, 47, 58]. Another characteristic associated with members of these families is the modulation of the immune system [59, 60]. The relationship between *Lachnospiraceae* and the immune system has previously been described, showing that colonization with *Lachnospiraceae* in *mdr2* *-/-* mice pre-treated with antibiotics caused a reduction in liver fibrosis, inflammation, and pathobiont translocation, which could be mediated by *Lachnospiraceae* metabolites, such as SCFA [61].

The positive correlation between the relative abundance of *Lactobacillaceae* and IL-10 levels suggests that supplementation with these potentially probiotic strains may be associated with beneficial modulation of the immune response. Species of the *Lactobacillaceae* family are used as probiotics to improve human or animal health [22], including anti-inflammatory properties [62, 63]. The effects of probiotics on the immune system are mainly explained due to their capability of increasing SCFA production [59]. Among the SCFA, butyrate has been typically associated with these anti-inflammatory effects, in addition to providing energy to colonic epithelial cells and regulating the expression of intestinal barrier junction proteins [61, 64].

The gut microbiota composition was also assessed at the genus level, with twenty genera identified. *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium* are the most abundant bacterial genera in the gut microbiota [65]. In the present study, the genera with the highest relative abundance were *Lactobacillus*, *Prevotella*, and *Anaerobiospirillum*. The genus *Anaerobiospirillum* is underexplored in the literature. However, there are case reports of diseases associated with certain species of this bacterial genus, mainly in immunocompromised hosts [66], but no reports of harmful effects at the fecal level were found. On the other hand, the treatment with *L. fermentum* at different doses showed effects in reducing *Turicibacter* genus compared to the CTL group. Few studies have evaluated this genus, but it has been reported that some species may have pathobiotic properties and may be associated with host inflammation [67].

Increased *Lactobacillus* counts in the feces of rats treated with *L. fermentum* strains have been previously documented [26, 68], and the present study demonstrated that the relative abundance of this bacterial genus was evident in the groups treated with different doses of the potentially probiotic *L. fermentum* strains, reinforcing the ability of these strains to modulate the *Lactobacillus* genus in the gut microbiota. The benefits of *Lactobacillus* when used as a probiotic have been linked to improvements in metabolic, immunological, and cardiovascular parameters and may be a promising alternative for the management of inflammatory bowel diseases and cardiometabolic disorders [69-71].

Prevotella was one of the genera with the most increase by our treatment with *L. fermentum*. This genus belongs to the family *Prevotellaceae*, and compared to other genera, *Prevotella* has received less attention [72]. *Prevotella* species can have different characteristics between and within species, but their functions and host relationship are still unclear [73]. Although the abundance of this bacterial genus is evident in the healthy microbiota, studies have suggested that some members may be associated with diseases, including bacterial vaginosis and inflammatory autoimmune diseases, but with direct causes still uncertain [72, 74, 75]. There are conflicting reports in the literature regarding the effects of the genus *Prevotella* on glucose homeostasis [72, 76]. However, a previous study with germ-free mice transplanted with microbiota from human donors and subjected to consumption of bread based on barley grains showed an improvement in glucose metabolism

associated with a greater abundance of *Prevotella*, possibly related to increased hepatic glycogen storage [77].

Generally, probiotics are effective at oral doses greater than 10^6 CFU, but the most used doses in experiments are 10^8 to 10^{10} CFU/mL [78]. Regarding the dose-response, in the present study, it was demonstrated in female rats that treatment with *L. fermentum* 139, 263, and 296 promoted a greater relative abundance of the *Lactobacillus* genus in the Lf- 10^8 group compared to CTL and Lf- 10^{10} groups. On the other hand, in male rats, the Lf- 10^8 and Lf- 10^{10} groups had a lower relative abundance of the genus *Lactobacillus* compared to the CTL group. A previous study found that the dose-response effects of *Bifidobacterium infantium* 35624 were effective in reducing irritable bowel syndrome in adult women with the 10^8 CFU/day dose, with no significant difference between the 10^6 and 10^{10} CFU/day doses and placebo [79]. The combination of these results suggests that more studies are needed to evaluate the effects of the dose-response of probiotics. Although treatment with the *L. fermentum* 139, 263, and 296 was more evident in the relative abundance of *Lactobacillus* in female rats, the data from this study demonstrate by the first time the evaluation of the effects of treatment with these strains at different doses on the gut microbiota composition at the gender level.

Another critical parameter evaluated in this study was the effect of the administration of *L. fermentum* 139, 263, and 296 on the alpha diversity of the gut microbiota in male and female rats. Increased microbial diversity has been associated with better microbiota stability, with implications for host health benefits [80]. The treatment with the higher dose of *L. fermentum* 139, 263, and 296 increased the alpha diversity of the gut microbiota of male rats. The effects of these strains on the diversity of the intestinal microbiota have already been previously evaluated. However, these strains did not increase the alpha diversity in rats fed a diet high in fat and cholesterol [71]. A lower diversity of the gut microbiota may be associated with clinical conditions such as obesity and inflammatory bowel diseases [70, 81, 82]. These findings demonstrate that the response of the gut microbiota diversity to treatment with probiotics may vary according to the health condition of the host.

In conclusion, treatment with different doses of the potentially probiotic strains of *L. fermentum* 139, 263, and 296 in male and female rats promoted changes in the composition of the gut microbiota in both sexes, with an increase in the relative abundance of phyla,

families, and genera with reported benefits for the host health, and an increase in the alpha diversity in the intestinal microbiota of male rats. In addition, the treatment modulated the immune system by promoting positive correlations between the *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* families and inflammatory cytokines.

Author Contribution

Conceptualization: JLBA. Data curation: LACS, JLBA and JPRCN. Formal analysis: JLBA and RDO. Funding acquisition: ELS, JLBA; investigation: LACS, RDO, KARO, KBS, MLVD, MOLF, JLBA. methodology: LACS, RDO, KBS, ELS, JLBA. project administration: JLBA. Supervision: JLBA. Validation: LACS, JLBA. Visualization, writing—original draft: LACS, JPRCN, DEAL, MOLF, JLBA. Writing—review and editing: RDOC, KARO, KBS, VACA, ELS and JLBA.

Funding

This study was funded by CNPq (Brazil) (Grant 404353/2021–5) and CAPES (Brazil) (Finance code 001).

Data Availability

The datasets generated during and or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

5 References

1. Silvestre, C. M. R. F. (2016). O diálogo entre o cérebro e o intestino: qual o papel dos probióticos?: revisão de literatura. Dissertation, University of Lisboa.
2. Jethwani P & Grover K (2019). Gut Microbiota in Health and Diseases – A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 8(8): 1586-1599. doi: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.808.187>
3. Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J. Z., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC microbiology*, 16, 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
4. Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S., & Yamashiro, Y. (2017). Ontogenesis of the Gut Microbiota Composition in Healthy, Full-Term, Vaginally Born and Breast-Fed Infants over the First 3 Years of Life: A Quantitative Bird's-Eye View. *Frontiers in microbiology*, 8, 1388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01388>
5. Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
6. Kim, H. I., Yun, S. W., Han, M. J., Jang, S. E., & Kim, D. H. (2020). IL-10 Expression-Inducing Gut Bacteria Alleviate High-Fat Diet-Induced Obesity and Hyperlipidemia in Mice. *Journal of microbiology and biotechnology*, 30(4), 599–603. <https://doi.org/10.4014/jmb.1912.12014>
7. Yurkovetskiy, L., Burrows, M., Khan, A. A., Graham, L., Volchkov, P., Becker, L., Antonopoulos, D., Umesaki, Y., & Chervonsky, A. V. (2013). Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity*, 39(2), 400–412. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.013>
8. Dominianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2015). Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PloS one*, 10(4), e0124599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124599>
9. Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., & Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation

- in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome medicine*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>
10. Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed research international*, 2018, 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
 11. Park, J. S., Choi, J. W., Jhun, J., Kwon, J. Y., Lee, B. I., Yang, C. W., Park, S. H., & Cho, M. L. (2018). *Lactobacillus acidophilus* Improves Intestinal Inflammation in an Acute Colitis Mouse Model by Regulation of Th17 and Treg Cell Balance and Fibrosis Development. *Journal of medicinal food*, 21(3), 215–224. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3990>
 12. Barteneva, N. S., Baiken, Y., Fasler-Kan, E., Alibek, K., Wang, S., Maltsev, N., Ponomarev, E. D., Sautbayeva, Z., Kauanova, S., Moore, A., Beglinger, C., & Vorobjev, I. A. (2017). Extracellular vesicles in gastrointestinal cancer in conjunction with microbiota: On the border of Kingdoms. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1868(2), 372–393. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.06.005>
 13. Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed research international*, 2015, 505878. <https://doi.org/10.1155/2015/505878>
 14. de la Visitación, N., Robles-Vera, I., Toral, M., & Duarte, J. (2019). Protective Effects of Probiotic Consumption in Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. *Nutrients*, 11(11), 2676. <https://doi.org/10.3390/nu11112676>
 15. Liu, R. T., Walsh, R. F. L., & Sheehan, A. E. (2019). Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 102, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.023>
 16. Shi, C. W., Cheng, M. Y., Yang, X., Lu, Y. Y., Yin, H. D., Zeng, Y., Wang, R. Y., Jiang, Y. L., Yang, W. T., Wang, J. Z., Zhao, D. D., Huang, H. B., Ye, L. P., Cao, X., Yang, G. L., & Wang, C. F. (2020). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG

- Promotes Mouse Gut Microbiota Diversity and T Cell Differentiation. *Frontiers in microbiology*, 11, 607735. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607735>
17. Barkhidarian, B., Roldos, L., Iskandar, M. M., Saedisomeolia, A., & Kubow, S. (2021). Probiotic Supplementation and Micronutrient Status in Healthy Subjects: A Systematic Review of Clinical Trials. *Nutrients*, 13(9), 3001. <https://doi.org/10.3390/nu13093001>
 18. López-Moreno, A., Suárez, A., Avanzi, C., Monteoliva-Sánchez, M., & Aguilera, M. (2020). Probiotic Strains and Intervention Total Doses for Modulating Obesity-Related Microbiota Dysbiosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Nutrients*, 12(7), 1921. <https://doi.org/10.3390/nu12071921>
 19. Meng, Y., Wang, J., Wang, Z., Zhang, G., Liu, L., Huo, G., & Li, C. (2019). *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 Ameliorates Impaired Intestinal Immunity and Metabolic Disorders in Cyclophosphamide-Treated Mice. *Frontiers in microbiology*, 10, 731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00731>
 20. Motevaseli, E., Khorramizadeh, M. R., Hadjati, J., Bonab, S. F., Eslami, S., & Ghafouri-Fard, S. (2018). Investigation of antitumor effects of *Lactobacillus crispatus* in experimental model of breast cancer in BALB/c mice. *Immunotherapy*, 10(2), 119–129. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0088>
 21. Ma, W., Li, W., Yu, S., Bian, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Z., Ma, Q., & Huang, L. (2023). Immunomodulatory effects of complex probiotics on the immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. *Frontiers in microbiology*, 14, 1055197. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1055197>
 22. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). 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*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
 23. De Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2018). In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics*

- and antimicrobial proteins, 10(4), 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
24. Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., de Moraes Júnior, M. A., Lucena, B. T., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2016). Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in microbiology*, 7, 1371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
 25. Cruz-Neto, J. P. R., de Oliveira, A. M., de Oliveira, K. Á. R., Sampaio, K. B., da Veiga Dutra, M. L., de Luna Freire, M. O., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2023). Safety Evaluation of a Novel Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* in Rats. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10.1007/s12602-023-10077-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10077-3>
 26. Cavalcante, R. G. S., de Albuquerque, T. M. R., de Luna Freire, M. O., Ferreira, G. A. H., Carneiro Dos Santos, L. A., Magnani, M., Cruz, J. C., Braga, V. A., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2019). The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 29(12), 1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>
 27. De Luna Freire, M. O., do Nascimento, L. C. P., de Oliveira, K. Á. R., de Oliveira, A. M., Napoleão, T. H., Lima, M. D. S., Lagranha, C. J., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2021). Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(9), 2202. <https://doi.org/10.3390/foods10092202>
 28. De Luna Freire, M. O., do Nascimento, L. C. P., de Oliveira, K. Á. R., de Oliveira, A. M., dos Santos Lima, M., Napoleão, T. H., ... & de Brito Alves, J. L. (2021). *Limosilactobacillus fermentum* strains with claimed probiotic properties exert antioxidant and anti-inflammatory properties and prevent cardiometabolic disorder in female rats fed a high-fat diet. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-13.
 29. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.

30. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011 Aug 15;27(16):2194-200. <https://doi:10.1093/bioinformatics/btr381>
31. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. <https://doi:10.7717/peerj.2584>
32. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.
33. Valeri, F., & Endres, K. (2021). How biological sex of the host shapes its gut microbiota. *Frontiers in neuroendocrinology*, 61, 100912. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100912>
34. Poutahidis, T., Springer, A., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B. J., Lakritz, J. R., Ibrahim, Y. M., Chatzigiagkos, A., Alm, E. J., & Erdman, S. E. (2014). Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PloS one*, 9(1), e84877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084877>
35. Lee, J. Y., Kim, N., Nam, R. H., Sohn, S. H., Lee, S. M., Choi, D., Yoon, H., Kim, Y. S., Lee, H. S., & Lee, D. H. (2017). Probiotics reduce repeated water avoidance stress-induced colonic microinflammation in Wistar rats in a sex-specific manner. *PloS one*, 12(12), e0188992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188992>
36. Gomaa E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
37. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Poeso, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The *Firmicutes/Bacteroidetes* Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients*, 12(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
38. Tsai, H. J., Tsai, W. C., Hung, W. C., Hung, W. W., Chang, C. C., Dai, C. Y., & Tsai, Y. C. (2021). Gut Microbiota and Subclinical Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*, 13(8), 2679. <https://doi.org/10.3390/nu13082679>

39. Rodiño-Janeiro, B. K., Vicario, M., Alonso-Cotner, C., Pascua-García, R., & Santos, J. (2018). A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Advances in therapy*, 35(3), 289–310. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0673-5>
40. Mathur, R., & Barlow, G. M. (2015). Obesity and the microbiome. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9(8), 1087–1099. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1051029>
41. Turróni, F., Ventura, M., Buttó, L. F., Duranti, S., O'Toole, P. W., Motherway, M. O., & van Sinderen, D. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(2), 183–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>
42. Frappier, M., Auclair, J., Bouasker, S., Gunaratnam, S., Diarra, C., & Millette, M. (2022). Screening and Characterization of Some Lactobacillaceae for Detection of Cholesterol-Lowering Activities. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 14(5), 873–883. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09959-9>
43. Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y., & Kim, Y. (2018). Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PloS one*, 13(2), e0192021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192021>
44. Paulino do Nascimento, L. C., Lacerda, D. C., Ferreira, D. J. S., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2022). *Limosilactobacillus fermentum*, Current Evidence on the Antioxidant Properties and Opportunities to be Exploited as a Probiotic Microorganism. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 14(5), 960–979. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09943-3>
45. Sorbara, M. T., Littmann, E. R., Fontana, E., Moody, T. U., Kohout, C. E., Gjonbalaj, M., Eaton, V., Seok, R., Leiner, I. M., & Pamer, E. G. (2020). Functional and Genomic Variation between Human-Derived Isolates of Lachnospiraceae Reveals Inter- and Intra-Species Diversity. *Cell host & microbe*, 28(1), 134–146.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.005>

46. Nogal, A., Valdes, A. M., & Menni, C. (2021). The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut microbes*, 13(1), 1–24. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>
47. Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
48. Lugli, G. A., Milani, C., Turrioni, F., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Ferrario, C., Modesto, M., Mattarelli, P., Jiří, K., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC genomics*, 18(1), 568. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3955-4>
49. Zuo, S., Wang, H., Zhao, Q., Tang, J., Wang, M., Zhang, Y., Sang, M., Tian, J., & Wang, P. (2023). High levels of Bifidobacteriaceae are associated with the pathogenesis of Parkinson's disease. *Frontiers in integrative neuroscience*, 16, 1054627. <https://doi.org/10.3389/fnint.2022.1054627>
50. Barandouzi, Z. A., Starkweather, A. R., Henderson, W. A., Gyamfi, A., & Cong, X. S. (2020). Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review. *Frontiers in psychiatry*, 11, 541. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00541>
51. Van Hecke, T., De Vrieze, J., Boon, N., De Vos, W. H., Vossen, E., & De Smet, S. (2019). Combined Consumption of Beef-Based Cooked Mince and Sucrose Stimulates Oxidative Stress, Cardiac Hypertrophy, and Colonic Outgrowth of Desulfovibrionaceae in Rats. *Molecular nutrition & food research*, 63(2), e1800962. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800962>
52. Tachon, S., Lee, B., & Marco, M. L. (2014). Diet alters probiotic *Lactobacillus* persistence and function in the intestine. *Environmental microbiology*, 16(9), 2915–2926. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12297>
53. Lee, S. M., Kim, N., Yoon, H., Kim, Y. S., Choi, S. I., Park, J. H., & Lee, D. H. (2021). Compositional and Functional Changes in the Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome Patients. *Gut and liver*, 15(2), 253–261. <https://doi.org/10.5009/gnl19379>
54. Xu, D., Feng, M., Chu, Y., Wang, S., Shete, V., Tuohy, K. M., Liu, F., Zhou, X., Kamil, A., Pan, D., Liu, H., Yang, X., Yang, C., Zhu, B., Lv, N., Xiong, Q., Wang, X., Sun, J., Sun, G., & Yang, Y. (2021). The Prebiotic Effects of Oats on Blood

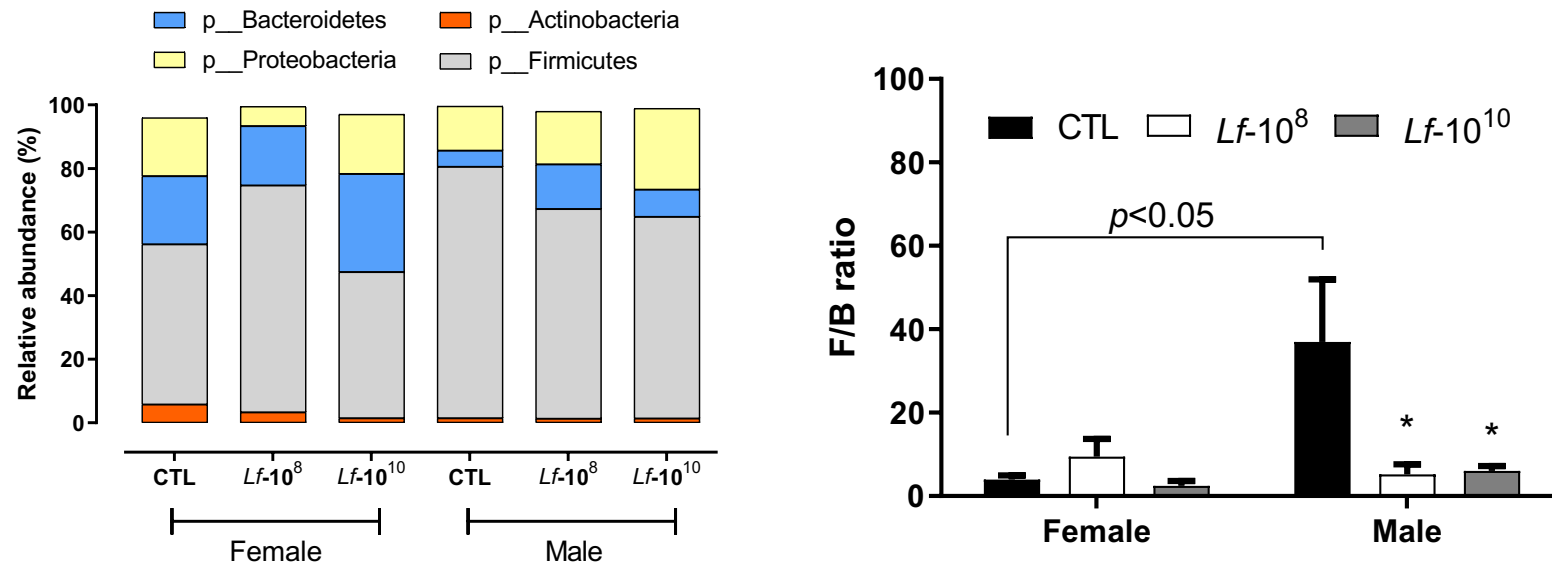
- Lipids, Gut Microbiota, and Short-Chain Fatty Acids in Mildly Hypercholesterolemic Subjects Compared With Rice: A Randomized, Controlled Trial. *Frontiers in immunology*, 12, 787797. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.787797>
55. Tamura, M., Hoshi, C., Kobori, M., Takahashi, S., Tomita, J., Nishimura, M., & Nishihira, J. (2017). Quercetin metabolism by fecal microbiota from healthy elderly human subjects. *PloS one*, 12(11), e0188271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188271>
56. Sampaio, K. B., Luiz de Brito Alves, J., Manguiera do Nascimento, Y., Fechine Tavares, J., Sobral da Silva, M., Dos Santos Nascimento, D., Dos Santos Lima, M., Priscila de Araújo Rodrigues, N., Fernandes Garcia, E., & Leite de Souza, E. (2022). Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 161, 111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>
57. Sampaio, K. B., de Brito Alves, J. L., do Nascimento, Y. M., Tavares, J. F., da Silva, M. S., Dos Santos Nascimento, D., de Araújo Rodrigues, N. P., Monteiro, M. C., Garcia, E. F., & de Souza, E. L. (2023). Effects of Simulated Gastrointestinal Conditions on Combined Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, Quercetin, and/or Resveratrol as Bioactive Components of Novel Nutraceuticals. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10.1007/s12602-023-10046-w. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10046-w>
58. Zeng, H., Larson, K. J., Cheng, W. H., Bukowski, M. R., Safratowich, B. D., Liu, Z., & Hakkak, R. (2020). Advanced liver steatosis accompanies an increase in hepatic inflammation, colonic, secondary bile acids and Lactobacillaceae/Lachnospiraceae bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry*, 78, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108336>
59. Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., ... & Ianiro, G. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, 15(9), 2211. <https://doi.org/10.3390/nu15092211>

60. Huynh, U., & Zastrow, M. L. (2023). Metallobiology of Lactobacillaceae in the gut microbiome. *Journal of inorganic biochemistry*, 238, 112023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112023>
61. Awoniyi, M., Wang, J., Ngo, B., et al (2023). Protective and aggressive bacterial subsets and metabolites modify hepatobiliary inflammation and fibrosis in a murine model of PSC. *Gut*, 72(4), 671–685. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326500>
62. Kim, Y. S., Unno, T., Kim, B. Y., & Park, M. S. (2020). Sex Differences in Gut Microbiota. *The world journal of men's health*, 38(1), 48–60. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190009>
63. Han, S. K., Shin, Y. J., Lee, D. Y., Kim, K. M., Yang, S. J., Kim, D. S., Choi, J. W., Lee, S., & Kim, D. H. (2021). *Lactobacillus rhamnosus* HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *BMC microbiology*, 21(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02192-4>
64. Zhou, J., Li, M., Chen, Q., Li, X., Chen, L., Dong, Z., Zhu, W., Yang, Y., Liu, Z., & Chen, Q. (2022). Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery. *Nature communications*, 13(1), 3432. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31171-0>
65. Anwar, H., Iftikhar, A., Muzaffar, H., Almatroudi, A., Allemailem, K. S., Navaid, S., Saleem, S., & Khurshid, M. (2021). Biodiversity of Gut Microbiota: Impact of Various Host and Environmental Factors. *BioMed research international*, 2021, 5575245. <https://doi.org/10.1155/2021/5575245>
66. Inokuchi, R., Ishida, T., Maeda, J., Nakajima, S., Yahagi, N., & Matsumoto, A. (2014). Anaerobiospirillum succiniciproducens-induced bacteremia in a healthy man. *The American journal of emergency medicine*, 32(7), 812.e1–812.e8123. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.12.028>
67. Chung, Y., Ryu, Y., An, B. C., Yoon, Y. S., Choi, O., Kim, T. Y., Yoon, J., Ahn, J. Y., Park, H. J., Kwon, S. K., Kim, J. F., & Chung, M. J. (2021). A synthetic probiotic engineered for colorectal cancer therapy modulates gut microbiota. *Microbiome*, 9(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01071-4>
68. De Oliveira, Y., Cavalcante, R. G. S., Cavalcanti Neto, M. P., Magnani, M., Braga, V. A., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2020). Oral administration of

- Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. *Food & function*, 11(6), 5581–5594. <https://doi.org/10.1039/d0fo00514b>
69. Jakubczyk, D., Leszczyńska, K., & Górska, S. (2020). The Effectiveness of Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD)-A Critical Review. *Nutrients*, 12(7), 1973. <https://doi.org/10.3390/nu12071973>
70. Kong, C., Gao, R., Yan, X., Huang, L., & Qin, H. (2019). Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 60, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.002>
71. Ferreira, G. A. H., Magnani, M., Cabral, L., Brandão, L. R., Noronha, M. F., de Campos Cruz, J., de Souza, E. L., & de Brito Alves, J. L. (2022). Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 14(2), 349–359. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>
72. Tett, A., Pasoli, E., Masetti, G., Ercolini, D., & Segata, N. (2021). *Prevotella* diversity, niches and interactions with the human host. *Nature reviews. Microbiology*, 19(9), 585–599. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>
73. Larsen J. M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>
74. Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., & Littman, D. R. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2, e01202. <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>
75. Si, J., You, H. J., Yu, J., Sung, J., & Ko, G. (2017). *Prevotella* as a Hub for Vaginal Microbiota under the Influence of Host Genetics and Their Association with Obesity. *Cell host & microbe*, 21(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.11.010>

76. Ley R. E. (2016). Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13(2), 69–70. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.4>
77. Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y. S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., & Bäckhed, F. (2015). Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell metabolism*, 22(6), 971–982. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>
78. Ouwehand A. C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial microbes*, 8(2), 143–151. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0140>
79. Whorwell, P. J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., Kiely, B., Shanahan, F., & Quigley, E. M. (2006). Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology*, 101(7), 1581–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00734.x>
80. Elderman, M., Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., van Beek, A., de Haan, B., Savelkoul, H., de Vos, P., & Faas, M. (2018). Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biology of sex differences*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0186-6>
81. Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., & Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
82. Sergeev, I. N., Aljutaily, T., Walton, G., & Huarte, E. (2020). Effects of Synbiotic Supplement on Human Gut Microbiota, Body Composition and Weight Loss in Obesity. *Nutrients*, 12(1), 222. <https://doi.org/10.3390/nu12010222>

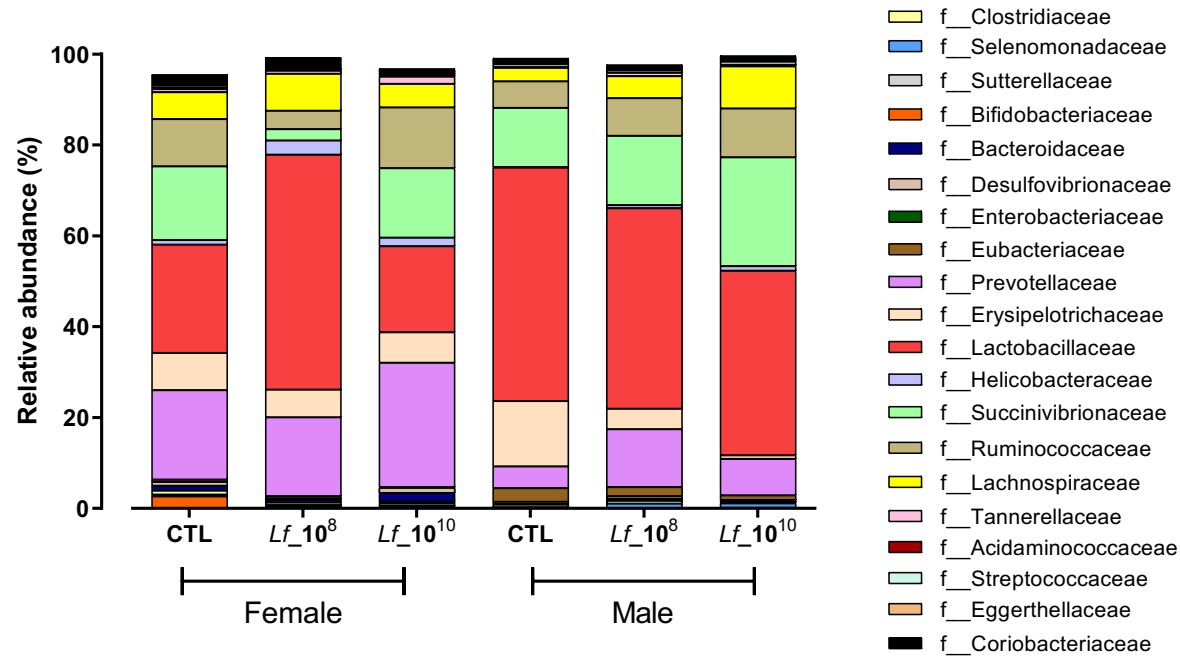
Figure 1. Relative abundance of Phylum (left) and *Firmicutes/Bacteroides* ratio (right) in feces of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, and 296 in different doses for 90 days.



Groups: control group (CTL): PBS, *L. fermentum* receiving a dose of 10⁸ CFU/mL (Lf-10⁸), and *L. fermentum* receiving a dose of 10¹⁰ CFU/mL (Lf-10¹⁰), both three groups are divided into male and female. Data of phylum's relative abundance are presented as mean ± standard deviation and analyzed by ANOVA one-way test. Data of F/B ratio are presented as mean ± standard deviation and analyzed by ANOVA two-way test. * p < 0.05 indicates a significant difference between CTL male and female groups.

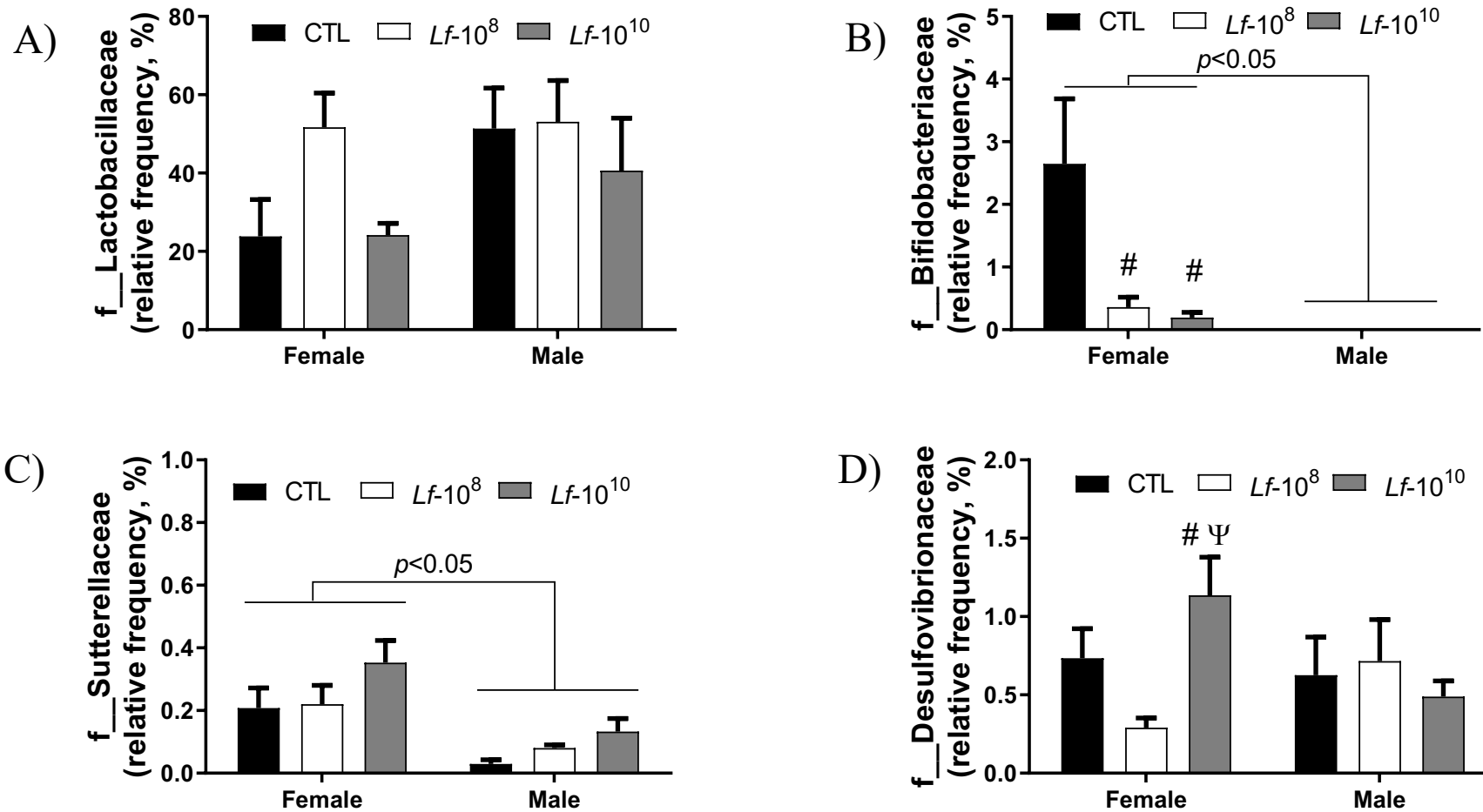
..

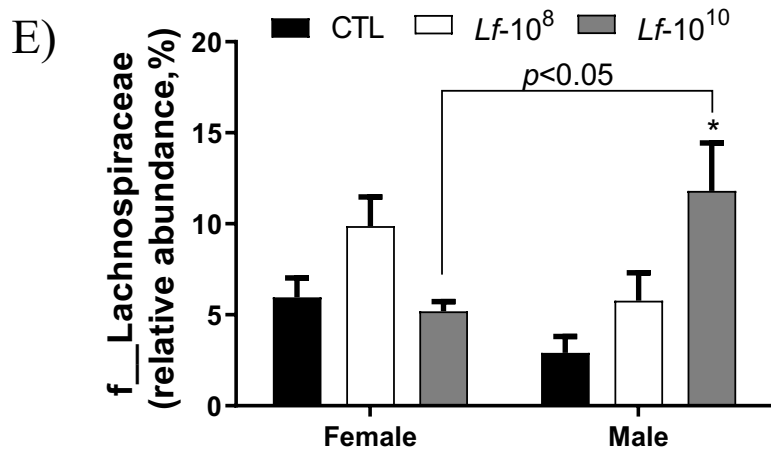
Figure 2. Relative abundance of bacterial families in feces of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days.



Groups: control group (CTL), *L. fermentum* receiving a dose of 10⁸ CFU/mL (Lf-10⁸), and *L. fermentum* receiving a dose of 10¹⁰ CFU/mL (Lf-10¹⁰), the three groups are divided into male and female.

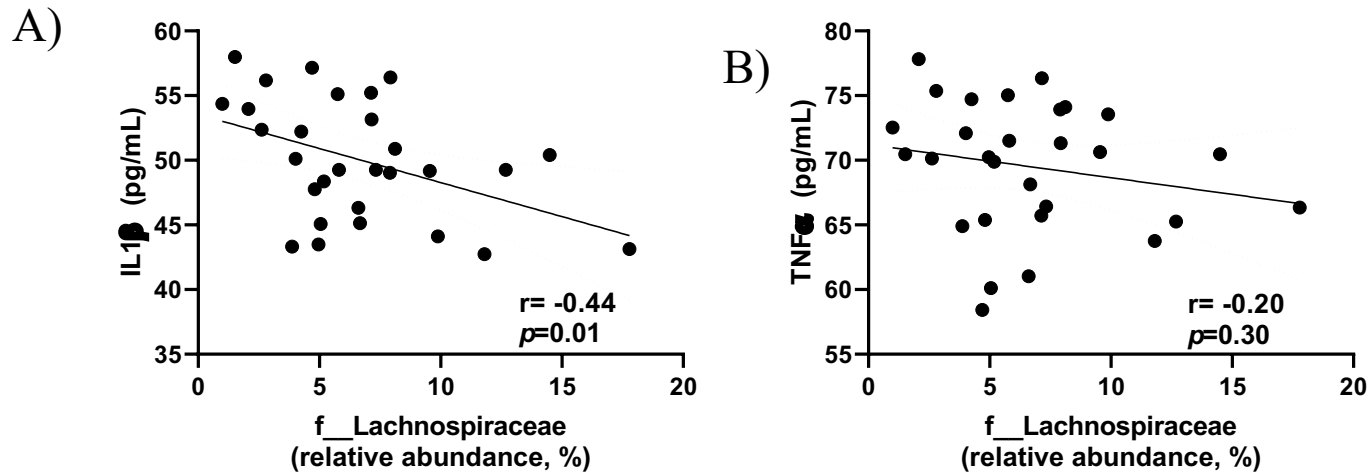
Figure 3. Relative frequency and relative abundance of Family of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days.

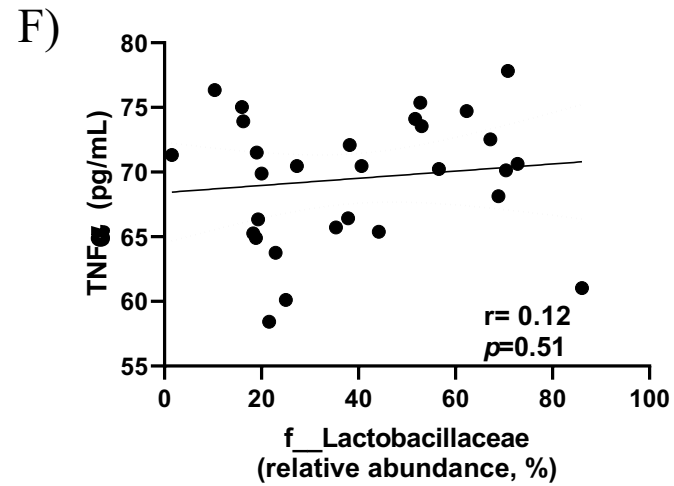
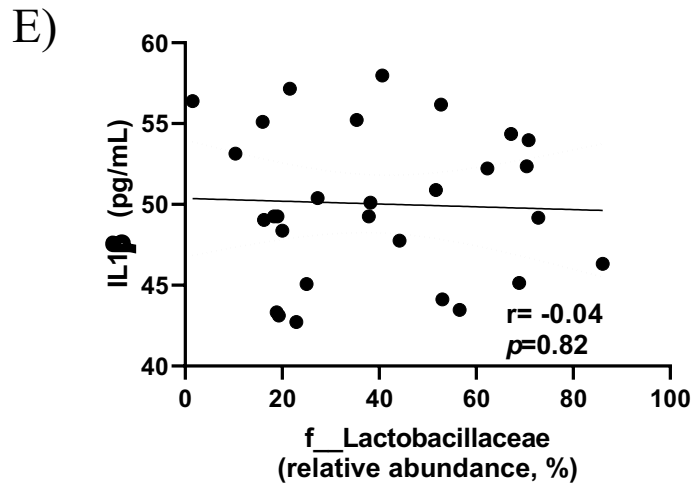
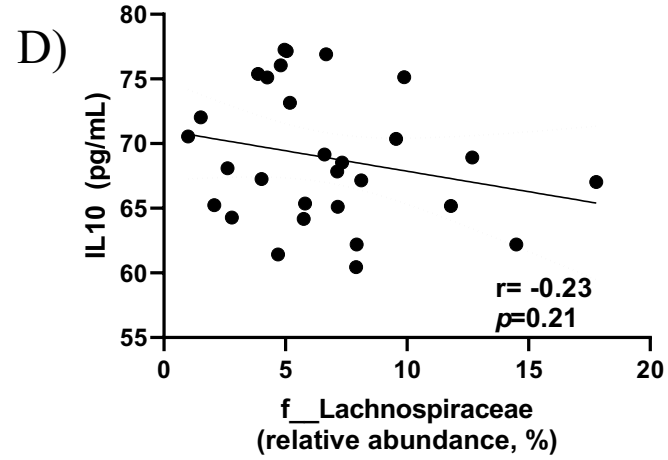
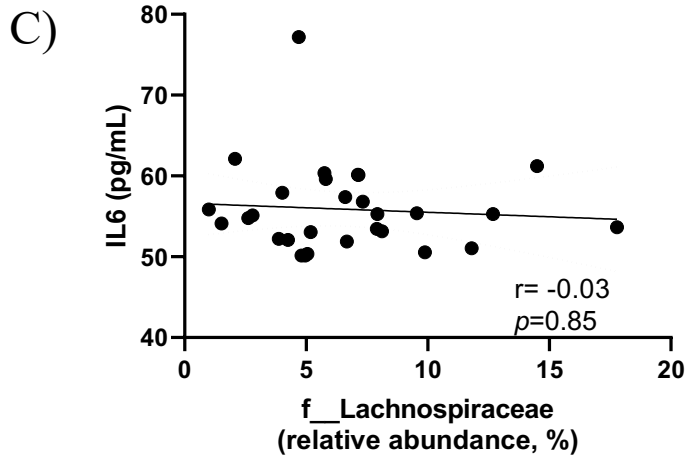


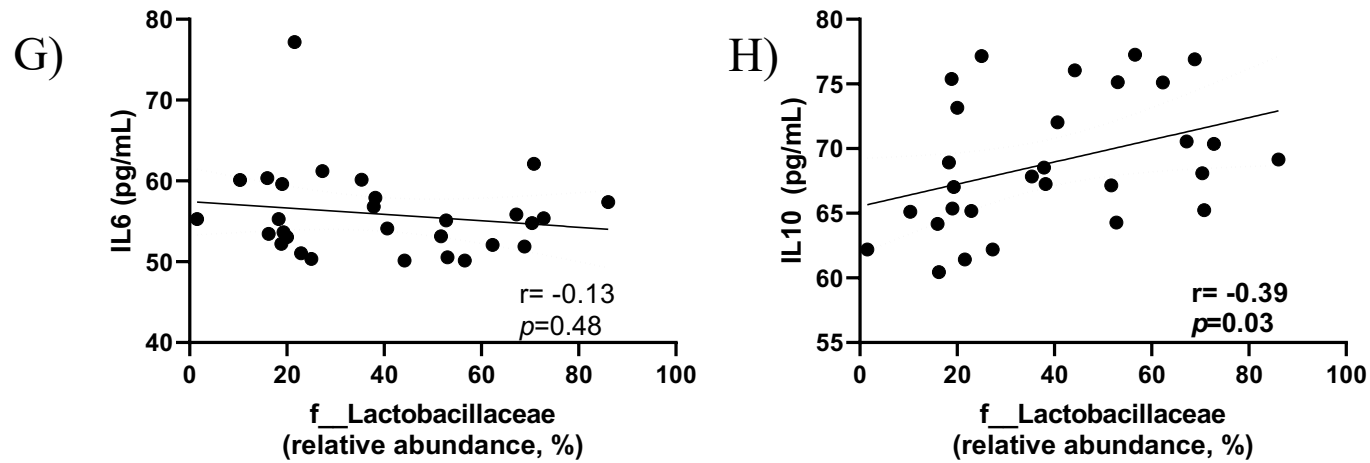


Groups: control group (CTL), *L. fermentum* receiving a dose of 10⁸ CFU/mL (Lf-10⁸), and *L. fermentum* receiving a dose of 10¹⁰ CFU/mL (Lf-10¹⁰), both three groups are divided into male and female. Assessment of *Lactobacillaceae* relative frequency (A), *Bifidobacteriaceae* relative frequency (B), *Sutterellaceae* relative frequency (C), *Desulfovibrionaceae* relative frequency (D), *Lachnospiraceae* relative abundance (E). Data are presented as mean \pm standard deviation and analyze by ANOVA two-way test. * $p < 0.05$ indicates significant difference between Lf-10¹⁰ male and female group. # $p < 0.05$ indicates significant difference between Lf-10⁸ or Lf-10¹⁰ and CTL group. $\Psi p < 0.05$ indicates significant difference between Lf-10¹⁰ and Lf-10⁸.

Figure 4. Correlation of cytokines serum levels and relative abundance of *Lachnospiraceae* and *Lactobacillaceae* of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days.

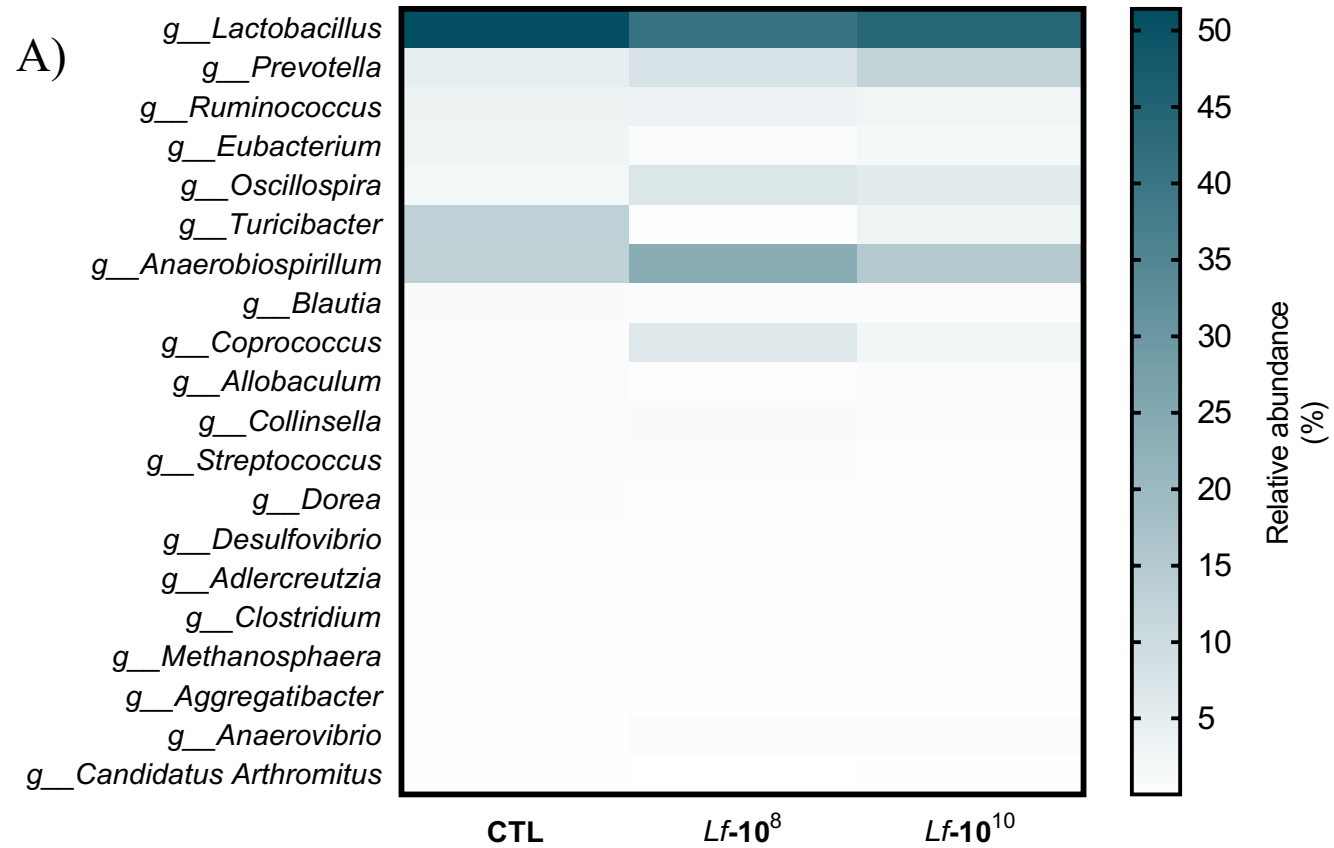


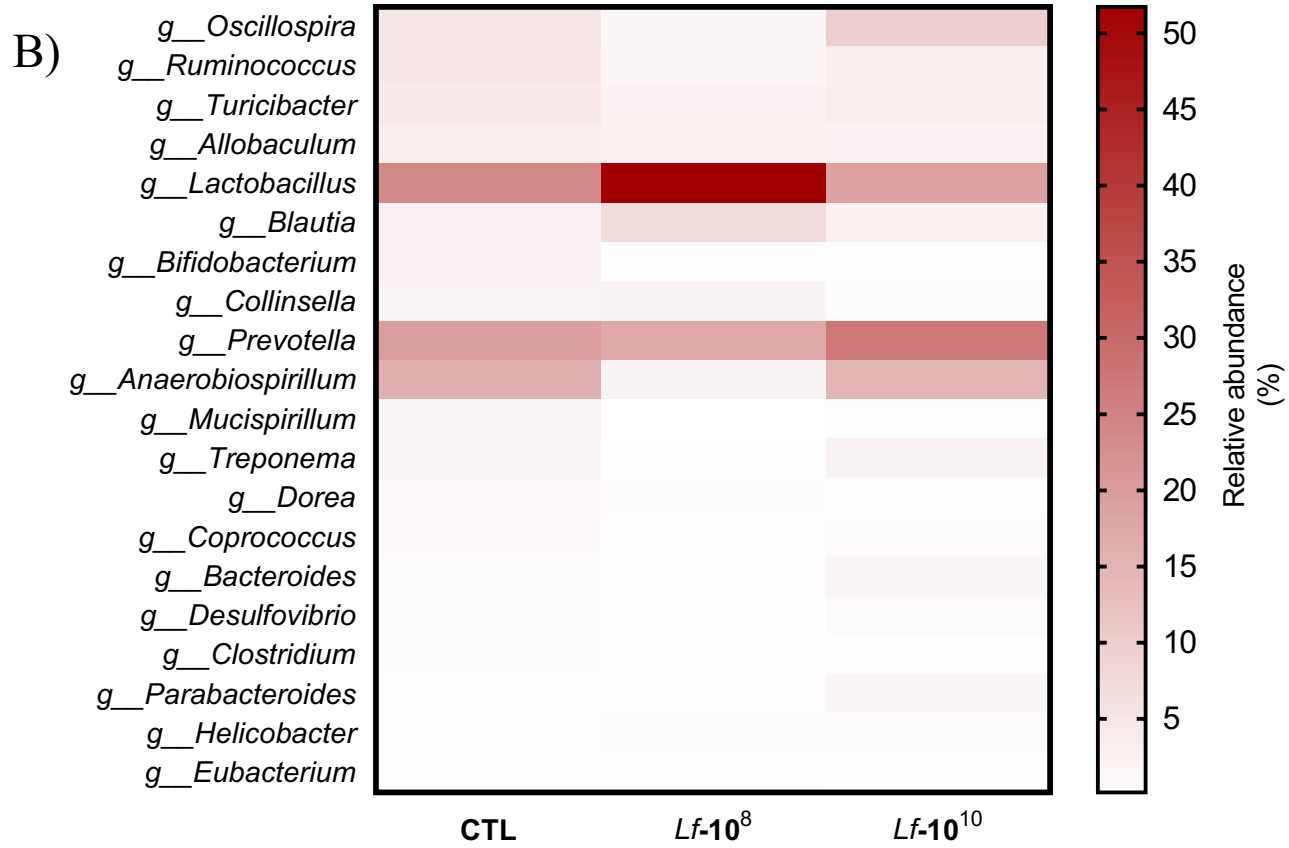




Groups: control group (CTL), *L. fermentum* receiving a dose of 10^8 CFU/mL (Lf- 10^8), and *L. fermentum* receiving a dose of 10^{10} CFU/mL (Lf- 10^{10}), both three groups are divided into male and female. Assessment of *Lachnospiraceae* relative abundance correlation with IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-10 (D), and *Lactobacillaceae* relative abundance correlation with IL-1 β (E), TNF- α (F), IL-6 (G), IL-10 (H).

Figure 5. Heat map of bacterial genus of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days.

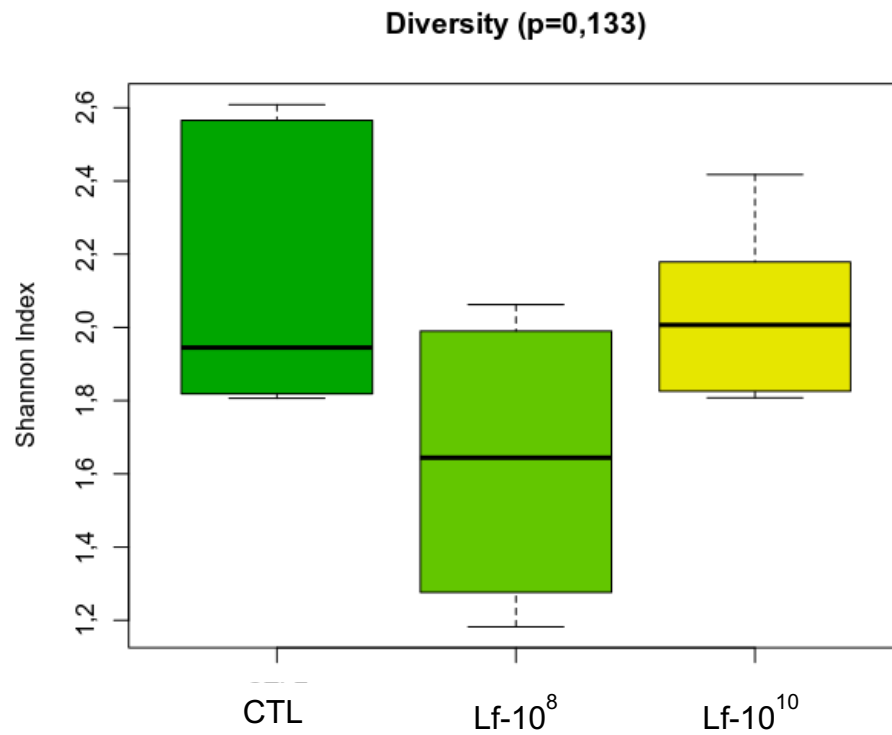




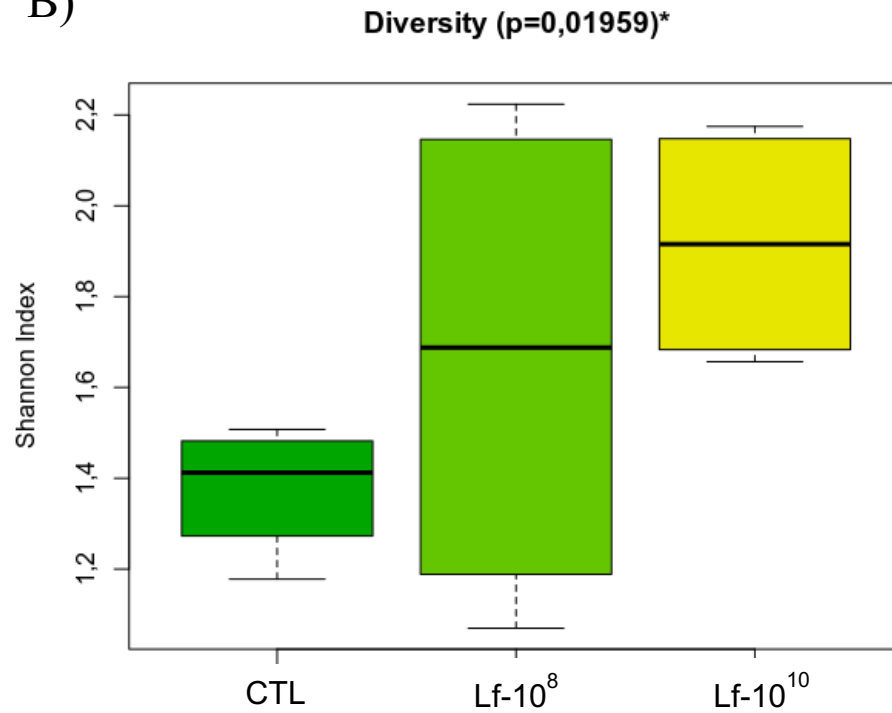
Groups: control group (CTL), *L. fermentum* receiving a dose of 10^8 CFU/mL (Lf- 10^8), and *L. fermentum* receiving a dose of 10^{10} CFU/mL (Lf- 10^{10}), both three groups are divided into male (A) and female (B).

Figure 6. Bacterial diversity of male and female Wistar rats after administration of *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263, 296 in different doses for 90 days.

A)



B)



Groups: control group (CTL), *L. fermentum* receiving a dose of 10^8 CFU/mL (Lf- 10^8), and *L. fermentum* receiving a dose of 10^{10} CFU/mL (Lf- 10^{10}), both three groups are divided into male and female. Data are presented as mean \pm standard deviation and analyze by ANOVA one-way test.

* $p < 0.05$ indicates significant difference between male and female group.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação pela comissão de ética no uso de animais de laboratório (CEUA)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SEGURANÇA DO MIX PROBIÓTICO *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 e 296 EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 1871160322 (ID 001662), sob a responsabilidade de **José Luiz de Brito Alves** e equipe; *José Patrocínio Ribeiro Cruz Neto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 01/06/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF INTESTINAL MICROBIOTA COLONIZATION AND SAFETY OF THE PROBIOTIC MIX *Limosilactobacillus fermentum* 139, 263 and 296 IN WISTAR RATS", utilizing 60 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1871160322 (ID 001662), under the responsibility of **José Luiz de Brito Alves** and team; *José Patrocínio Ribeiro Cruz Neto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 06/01/2022.

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

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **09/2022** Área: **Nutrição**

Origem: **Biotério Convencional de Roedores do Departamento de Fisiologia e Patologia (UFPE)**

Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **30 a 60 dias** N: **60**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar** Peso: **40 a 100 g**

Local do experimento: Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição - CCS/UFPB.

João Pessoa, 24 de agosto de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba