

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

DEBORAH EMANUELLE DE ALBUQUERQUE LEMOS

**EFEITOS DE UM NUTRACÊUTICO (*LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM*
(139, 263, 296) E CASCA DE JABUTICABA) NA MICROBIOTA INTESTINAL
E TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL EM RATAS
WISTAR E SUA ATIVIDADE NA SAÚDE CARDIOMETABÓLICA DA PROLE**

João Pessoa

2025

DEBORAH EMANUELLE DE ALBUQUERQUE LEMOS

**EFEITOS DE UM NUTRACÊUTICO (*LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM*
(139, 263, 296) E CASCA DE JABUTICABA) NA MICROBIOTA INTESTINAL
E TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL EM RATAS
WISTAR E SUA ATIVIDADE NA SAÚDE CARDIOMETABÓLICA DA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Nutrição
do Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Nutrição.

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

João Pessoa

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

L557e Lemos, Deborah Emanuelle de Albuquerque.

Efeitos de um nutracêutico (*Limosilactobacillus fermentum* (139, 263, 296) e casca de jabuticaba) na microbiota intestinal e tratamento do diabetes mellitus gestacional em ratas Wistar e sua atividade na saúde cardiometabólica da prole / Deborah Emanuelle de Albuquerque Lemos. - João Pessoa, 2025.

88 f. : il.

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

1. Diabetes mellitus - Gestação. 2. Nutracêutico. 3. Microbiota intestinal. 4. Fatores de risco cardiometabólico. I. Alves, José Luiz de Brito. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

DEBORAH EMANUELLE DE ALBUQUERQUE LEMOS

**EFEITOS DE UM NUTRACÊUTICO (*LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM*
(139, 263, 296) E CASCA DE JABUTICABA) NA MICROBIOTA INTESTINAL
E TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL EM RATAS
WISTAR E SUA ATIVIDADE NA SAÚDE CARDIOMETABÓLICA DA PROLE**

Dissertação aprovada em 27 de Fevereiro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Presidente

Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia

Membro interno – Titular

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Membro interno – Suplente

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos

Membro externo – Titular

Prof. Dr. Marinaldo Pacífico Cavalcanti Neto

Membro externo – Suplente

AGRADECIMENTOS

A gratidão é a memória do coração. Não concretizo hoje essa realização importante sozinha. A autossuficiência não nos cabe. Às muitas pessoas que me ajudaram durante essa jornada, dedico este trabalho:

À Deus, meu Pai, por me sustentar e guiar os meus caminhos. Sem Ele, nada do que foi feito se fez. À Ele, toda honra e glória para sempre!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz, sou grata pelas oportunidades de trabalho e expansão do conhecimento técnico-científico. Sempre me espelharei na sua paixão e compromisso com a ciência. Obrigada por aceitar meu convite, acreditar no meu potencial e estar junto comigo nessa trajetória.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Estefânia e Prof. Dr. Helioswilton, sou grata pelos ensinamentos e pelas contribuições para a melhora deste trabalho, desde a qualificação até a defesa. Nesta dissertação tem um pouco de vocês.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pelo suporte intelectual e estrutural. Tenho orgulho de ter trabalhado neste programa.

Aos Laboratórios que colaboraram com a execução desta pesquisa: Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (LMBA) e Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX).

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu marido, Renato, por ter sido um parceiro compreensivo, pelas noites de estudo, feriados e fins de semana dedicadas à pesquisa. Obrigada por compreender meus sacrifícios e apoiar meus sonhos na carreira acadêmica.

Aos meus pais, Augusto e Núbia, por sempre me incentivarem a investir nos estudos, onde descobri minha paixão pela ciência. Sou grata por investirem na minha educação escolar e me ensinarem a viver na escola da vida.

Ao meu avô, Marinézio, que sempre torce por mim, e diz: “Sou velho, já realizei meus sonhos, não tenho mais o que desejar, por isso, meus sonhos continuam em você.” Espero te honrar e te dar muito orgulho.

À equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional em Nutrição e Doenças Cardiometabólicas (LANUCAM), que deixaram meus dias de trabalho mais leves e divertidos.

À minha amiga Micaelle que esteve presente neste processo, do início ao fim, e que abraçou essa pesquisa e me ajudou como se fosse sua, se tornando meu braço direito na pesquisa. Alguém que ama a pesquisa tanto quanto eu. Você foi um presente que a ciência me deu.

À Jaelison, que dedicou seu tempo na produção do nutracêutico, abdicando de fins de semanas, sem horário de começar e terminar. Minha admiração por você será sempre a mesma.

À minha melhor amiga, Fernanda, que mesmo longe sempre se faz presente. Me alegro em compartilhar a vida com você, especialmente esta conquista.

RESUMO

Alterações na microbiota intestinal podem influenciar no desenvolvimento do diabetes mellitus gestacional (DMG), implicando em distúrbios sistêmicos, como o aumento da intolerância à glicose, resistência insulínica, desequilíbrios hormonais e maior grau de inflamação. A ingestão combinada de probióticos e prebióticos pode promover melhora em parâmetros associados com o DMG. Nesse sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos do tratamento com nutracêutico composto por liofilizado de cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (139, 263 e 296) e casca de jabuticaba na microbiota intestinal e no tratamento do DMG e sua atividade na saúde cardiometabólica da prole. Trata-se de um ensaio pré-clínico, no qual foram utilizadas 36 ratas *Wistar* divididas aleatoriamente em três grupos experimentais, sendo eles CTL (Controle, n=12), GDM (Diabetes gestacional+Veículo, n=12) e GDM+Nut (Diabetes gestacional+Nutraceutico, n=12). As ratas do grupo GDM e GDM+Nut receberam dieta hiperlipídica associada à solução com sacarose a 20%, e no dia 0 da gestação foi administrado uma dose única de estreptozotocina (25mg/kg). O tratamento diário das ratas do grupo GDM e GDM+Nut foi realizado por gavagem oral, com solução salina tamponada com fosfato como veículo (1ml) e nutracêutico (2g/kg), respectivamente, até o final da gestação. Foram realizadas a avaliação de consumo alimentar, ganho de peso gestacional, teste oral de tolerância à glicose e exames bioquímicos maternos. A prole foi reduzida aleatoriamente a fim de estabelecer 8 fêmeas e 8 machos por grupo, sendo eles, OCTL (prole do grupo CTL), OGDG (prole do grupo GDM) e OGDG+Nut (prole do grupo GDM+Nut). A prole foi medida e pesada do início ao final do experimento, sendo também realizado os testes de intolerância à glicose e resistência à insulina, avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e função autonômica. Os resultados desse estudo demonstraram que o grupo GDM apresentou intolerância à glicose. Entretanto, a administração da formulação nutracêutica foi capaz de reduzir a intolerância à glicose e os níveis de citocinas inflamatórias séricas como TNF- α e IL-6. A administração da formulação nutracêutica aumentou a proporção de Firmicutes/Bacteroidota e beta diversidade, porém, não alterou os índices de alfa diversidade quando comparados com o grupo GDM. Foi observado o aumento de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente butirato, como *Mediterraneibacter*, *Anaerostipes* e *Flavonifractor*. Avaliando os efeitos da administração materna da formulação nutracêutica na prole, houve aumento nos parâmetros de peso e comprimento ao nascer. Durante o desmame e puberdade, a prole feminina do grupo GDM+Nut apresentou aumento do comprimento e peso quando comparada com os descendentes dos outros grupos. A prole das ratas tratadas com a formulação nutracêutica não apresentou melhora na tolerância à glicose ao comparar com a prole de ratas GDM. Enquanto isso, a prole de ratas com diabetes gestacional apresentaram aumento de risco para doenças cardiovasculares, com aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média, além de disfunções no sistema nervoso autônomo. Entretanto, o consumo materno do nutracêutico durante a gestação, reduziu significativamente tais parâmetros na prole, e consequentemente, os riscos de desenvolver doenças cardiovasculares na vida adulta.

Palavras-chave: Diabetes gestacional. Nutraceutico. Microbiota intestinal. Fatores de risco cardiometabólico.

ABSTRACT

Changes in the gut microbiota can influence the development of gestational diabetes mellitus (GDM), which is associated with systemic disorders such as increased glucose intolerance, insulin resistance, hormonal imbalances and increased inflammation. The combined use of probiotics and prebiotics can promote improvements in parameters associated with GDM. With this in mind, the main objective of this study was to evaluate the effects of treatment with a nutraceutical composed of lyophilized strains of *Limosilactobacillus fermentum* (139, 263 and 296) and jaboticaba peel on the gut microbiota and the treatment of GDM, and its activity on the cardiometabolic health of offspring. This is a preclinical study in which 36 Wistar rats were randomly divided into three experimental groups: CTL (control, n = 12), GDM (gestational diabetes + vehicle, n = 12) and GDM+Nut (gestational diabetes + nutraceutical, n = 12). Rats in the GDM and GDM+Nut groups were fed a high-fat diet in combination with a 20% sucrose solution, and a single dose of streptozotocin (25 mg/kg) was administered on day 0 of gestation. Rats in the GDM and GDM+Nut groups were treated daily by oral gavage with phosphate-buffered saline vehicle (1ml) and nutraceuticals (2g/kg), respectively, until the end of gestation. Food consumption, gestational weight gain, oral glucose tolerance test and maternal biochemical tests were assessed. Offspring were randomly assigned to 8 females and 8 males per group: OCTL (CTL group offspring), OGDM (GDM group offspring) and OGDM+Nut (GDM+Nut group offspring). The offspring were measured and weighed from the beginning to the end of the experiment, and were also tested for glucose intolerance and insulin resistance, blood pressure, heart rate and autonomic function. The results of this study showed that the GDM group had glucose intolerance. However, administration of the nutraceutical formulation was able to reduce glucose intolerance and serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6. Administration of the nutraceutical formulation increased the Firmicutes/Bacteroidota ratio and beta diversity, but did not alter alpha diversity indices compared to the GDM group. An increase in bacteria producing short chain fatty acids, especially butyrate, was observed, such as *Mediterraneibacter*, *Anaerostipes* and *Flavonifractor*. Evaluating the effects of maternal administration of the nutraceutical formulation on the offspring, there was an increase in birth weight and length parameters. During weaning and puberty, the female offspring of the GDM+Nut group showed an increase in length and weight compared to the offspring of the other groups. The offspring of rats treated with the nutraceutical formulation showed no improvement in glucose tolerance compared with the offspring of GDM rats. Meanwhile, the offspring of gestational diabetes rats showed an increased risk of cardiovascular disease, with increases in systolic, diastolic and mean arterial pressure, as well as autonomic nervous system dysfunction. However, maternal consumption of the nutraceutical during pregnancy significantly reduced these parameters in the offspring and consequently the risk of developing cardiovascular disease in adulthood.

Keywords: Gestational diabetes. Nutraceutical. Gut microbiota. Cardiometabolic risk factors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Desenho Experimental das Ratas <i>Wistar</i> gestantes.....	28
Figura 2: Desenho Experimental da Prole.....	29
Figura 3: Técnica cirúrgica de implantação de catéteres para registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	32

FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: Experimental Design of Mothers and Offspring.....	58
Figure 2: Gestational weight gain, glycaemia and glucose tolerance in healthy pregnant rats (CTL), rats with gestational diabetes mellitus (GDM) and rats with GDM treated with nutraceutical during pregnancy twice a day (GDM+Nut).....	65
Figure 3: Administration of the nutraceutical containing freeze-dried jabuticaba peel and <i>L. fermentum</i> induces changes in the diversity and composition of the gut microbiota in GDM rats.....	68
Figure 4: Effects of a mixed formulation freeze-dried jabuticaba peel and <i>L. fermentum</i> on gut microbiota. Heatmap showing the relative abundance of microbial taxa at genus level.....	69
Figure 5: Glucose and insulin tolerance of the offspring of healthy rats (O-CTL), rats with GDM (O-GDM) and rats with GDM treated with a nutraceutical formulation of <i>L. fermentum</i> and jabuticaba peel (GDM+Nut).....	72
Figure 6: Cardiovascular health parameters of the offspring of healthy rats (O-CTL), rats with GDM (O-GDM), and rats with GDM treated with a nutraceutical formulation of <i>L. fermentum</i> and jabuticaba peel (GDM+Nut).....	73

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1: Composição da dieta controle e dislipidêmica.....	27
Tabela 2: Métodos utilizados para as análises hematológicas.....	31

TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Composition of control and high-fat diet (HFD) offered.....	57
Table 2: Hematological, biochemical and inflammatory parameters of healthy pregnant rats (CTL), with GDM receiving vehicle (GDM), and with GDM treated with nutraceutical (GDM+Nut - lyophilized <i>L. fermentum</i> 139, 263, 296 and jabuticaba peel) twice a day during pregnancy.....	66
Table 3: Correlation of alpha diversity indices and biochemical and inflammatory parameters in dams.....	70
Table 4: Weight and length of the offspring of the CTL (O-CTL), GDM (O-GDM) and GDM+Nut (O-GDM+Nut) groups from birth to adolescence.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 ASPECTOS GERAIS DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL.....	13
2.1.1 Fatores de risco e fisiopatologia do diabetes mellitus gestacional	13
2.1.2 Efeitos do diabetes mellitus gestacional na prole	15
2.2 DISBIOSE INTESTINAL NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	17
2.3 USO DE PROBIÓTICOS E NUTRACÊUTICOS COMO TERAPIA ADJUVANTE NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	25
3.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	25
3.3 ELABORAÇÃO DO NUTRACÊUTICO.....	25
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	26
3.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	29
3.6 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	30
3.7 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	30
3.8 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS	31
3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	31
3.10 IMPLANTAÇÃO DE CATETERES E REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	32
3.11 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO AUTÔNOMICA E TÔNUS SIMPÁTICO	33
3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
4 RESULTADOS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
APÊNDICE.....	50
APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL.....	51
APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO.....	87
ANEXO.....	88
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	89

1 INTRODUÇÃO

As alterações glicêmicas são comuns na gravidez, de modo que, aproximadamente 16% dos nascidos vivos são provenientes de mulheres que apresentaram episódios de hiperglicemia durante o período gestacional (Zajdenverg *et al.*, 2022a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2014), o diabetes mellitus gestacional (DMG) é caracterizado por aumentos nos níveis glicêmicos devido à intolerância de grau variável aos carboidratos que geralmente cessa após o nascimento do bebê.

Desse modo, algumas complicações podem ser relacionadas aos quadros hiperglicêmicos, causando prejuízos à saúde da mãe e ao bebê desde malefícios perinatais até as fases subsequentes do ciclo de vida. Infecção urinária materna, desordens hipertensivas na gravidez e cesárea são alguns dos desfechos maternos mais observados (OPAS, 2017). Além disso, a exposição ao ambiente intrauterino hiperglicêmico pode gerar impactos negativos na saúde da prole, incluindo macrossomias e sequelas de má formações fetais, hipoglicemia neonatal, desconforto respiratório neonatal, como também alterações no metabolismo da glicose e outros nutrientes, aumentando a probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta como obesidade, hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2 (Bianco; Josefson, 2019; Farahvar; Walfish; Sheiner, 2018; OPAS, 2017; Tocantins *et al.*, 2022).

Nos últimos anos têm sido observado que alterações na composição da microbiota intestinal podem influenciar no desenvolvimento do DMG, implicando em desordens sistêmicas, a exemplo do aumento da intolerância à glicose, resistência insulínica, desequilíbrios hormonais, maior grau de inflamação e estresse oxidativo (Crusell *et al.*, 2018; Hasain *et al.*, 2020; Gorczyca *et al.*, 2022; Mendonça *et al.*, 2022; Pérez-Pérez *et al.*, 2020; Pinto *et al.*, 2023; Ponzo *et al.*, 2019).

Diante da relação entre disbiose intestinal e DMG, evidências têm demonstrado que o tratamento com cepas probióticas podem melhorar os parâmetros dessa doença através da redução dos níveis séricos de glicose, melhora do perfil lipídico, intolerância à glicose e resistência à insulina, além de reduzir biomarcadores inflamatórios e aumentar a capacidade de defesa antioxidante (Reyes-Muñoz *et al.*, 2023; Wickens *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2021).

Além do uso de probióticos no DMG, os prebióticos também auxiliam na prevenção de distúrbios metabólicos. Alguns dos efeitos benéficos exercidos pelos

prebióticos são demonstrados na homeostase da glicose, retardando e reduzindo a absorção da glicose, além de melhorar a sensibilidade à insulina e modular a composição da microbiota intestinal, servindo como substrato para fermentação seletiva de bactérias intestinais (Daley; Myrie, 2024; Kim; Keogh; Clifton, 2017; Miao *et al.*, 2022; Wan *et al.*, 2023; Wan; Ma, *et al.*, 2022). Diante da atuação dos probióticos e prebióticos na saúde, estudos apontaram resultados relevantes da ingestão combinada desses compostos na melhora dos parâmetros do DMG (Ahmadi *et al.*, 2016; Karamali *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2022; Swanson *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) é reconhecida por sua riqueza nutricional, composta de vitaminas, minerais e compostos fenólicos – antocianinas, polifenóis, taninos e flavonoides –, além de fibras alimentares, sobretudo solúveis (Marsiglia *et al.*, 2021; Massa *et al.*, 2020). Foi observado que o liofilizado da casca da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) possui atividade prebiótica, promovendo o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, além de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato e butirato (Massa *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2023). Com isso, o subproduto da jabuticaba torna-se um produto de valor nutricional agregado que pode exercer benefícios à saúde através da modulação da microbiota intestinal.

Foi visto que cepas potencialmente probióticas nomeadas *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) 139, 263 e 296 apresentaram bom desempenho para funcionalidades fisiológicas, além de não demonstrarem atividades hemolítica, mucinolítica e resistência aos diversos antibióticos (De Albuquerque *et al.*, 2018; Sampaio *et al.*, 2022; Dos Santos *et al.*, 2019). Estudos de fase pré-clínica do grupo demonstraram que a administração de uma formulação probiótica contendo essas três cepas de *L. fermentum* alterou a composição da microbiota intestinal, aumentou a produção de AGCC, reduziu a dislipidemia, melhorou a função autonômica, reduziu a pressão arterial, estresse oxidativo e mediadores inflamatórios em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (Ferreira *et al.*, 2022; Cavalcante *et al.*, 2019; De Luna Freire *et al.*, 2021a).

Portanto, a elaboração de uma formulação nutracêutica contendo a combinação de probióticos e alimentos ricos em compostos bioativos como o subproduto da jabuticaba vem sendo citada como estratégia para melhorar de forma conjunta suas propriedades promotoras de saúde (De Brito Alves *et al.*, 2016; Georgakouli *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2018). Análises do potencial desta formulação nutracêutica foram

realizadas *in vitro*, tornando-se necessária a realização de pesquisas adicionais de fase pré-clínica para avaliar os efeitos em organismos vivos (Silva *et al.*, 2023). Desse modo, a hipótese desse trabalho sugere que o tratamento com o nutracêutico composto pelo liofilizado de cepas probióticas de *L. fermentum* (139, 263, 296) e casca de jabuticaba produzirá efeitos benéficos na modulação da microbiota intestinal, causando efeitos indiretos na melhora da tolerância à glicose, no perfil bioquímico e nos biomarcadores inflamatórios em ratas *Wistar* com diabetes gestacional. Diante desse pressuposto, espera-se que o tratamento previna desfechos negativos na gestação, como abortos, natimortos e redução do risco de doenças cardiometabólicas na prole.

Apesar de haver na literatura a observação dos efeitos dessas cepas probióticas em estudos pré-clínicos, seus efeitos associados ao subproduto da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) no modelo de DMG ainda não foram investigados. Além disso, a linha de frente do tratamento do DMG restringe-se às orientações nutricionais personalizadas e práticas de atividade física (Zajdenverg *et al.*, 2022b), existindo assim a necessidade de investigar outras terapêuticas que possam ser adotadas como tratamento adjuvante. Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos do nutracêutico formulado pelo liofilizado de cepas de *L. fermentum* (139, 263, 296) e casca de jabuticaba na microbiota intestinal e tratamento do DMG e sua atividade na saúde cardiometabólica da prole.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

2.1.1. Fatores de risco e fisiopatologia do Diabetes Mellitus Gestacional

Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes (2017), aproximadamente 14% das gestações são afetadas pela DMG, correspondendo cerca de 18 milhões de casos anuais. Em 2023, um estudo de revisão sistemática e meta-análise estimou a prevalência da doença em 14% no Brasil – a partir de estudos publicados entre 2010 e 2021 –, sendo um percentual semelhante aos da China, Austrália e África (Mocellin *et al.*, 2024). Estudos indicam que a pandemia causada pela SARS-CoV2 contribuiu para um aumento de 38% na prevalência do DMG, atribuído ao estresse e às mudanças no estilo de vida, como redução da atividade física decorrente do isolamento social (Mirsky *et al.*, 2022). Além disso, quase 90% dos quadros hiperglicêmicos no período gravídico ocorrem em países de baixo e médio rendimento, os quais apresentam fragilidades nos cuidados da saúde de gestantes. Ademais, há variações dentro de cada país acerca da prevalência de DMG, uma vez que existem outros fatores que influenciam no desenvolvimento de diabetes mellitus na gestação (Zhu; Zhang, 2016).

Fatores de risco associados ao desenvolvimento do DMG incluem excesso de peso, dieta ocidentalizada, idade materna avançada e histórico familiar de diabetes mellitus, além do estilo de vida adotado no início da gestação (Plows, 2018; Ruiz-Gracia *et al.*, 2016). A obesidade está intimamente relacionada com o desenvolvimento de DMG, pois há uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas, incluindo a leptina que levam à inflamação crônica resultando em resistência insulínica (Sharma *et al.*, 2022).

Alguns estudos observaram o aumento do risco de desenvolvimento do DMG através da exposição a algumas substâncias como o uso de esteroides e corticoides, como por exemplo dexametasona e testosterona, medicamentos como metformina, metais pesados ingeridos juntamente com alimentos e bebidas, além da exposição à disruptores endócrinos químicos (DEQ), sobretudo bisfenol A e ftalatos (Filardi *et al.*, 2020; Lambers *et al.*, 2016; Nguyen; Chan; Teo, 2018; Tertti *et al.*, 2014; Rudge *et al.*, 2023). Essas substâncias auxiliam no aumento de peso, resistência à insulina, bem como disfunção das células β pancreática (Lambers *et al.*, 2016; Filardi *et al.*, 2020; Valero *et al.*, 2022).

Desse modo, os fatores de risco são indicadores prévios importantes a serem considerados, visto que podem predizer a suscetibilidade para o desenvolvimento do diabetes mellitus na gravidez.

Nos casos de gestações saudáveis, o organismo materno sofre alterações convenientes ao período com a finalidade de suprir as necessidades do feto em crescimento (Kohlhepp *et al.*, 2018). Durante a fase inicial da gravidez há um aumento da sensibilidade à insulina, de forma que gera uma elevação da captação de glicose pelo organismo materno com intuito de aumentar as reservas adiposas para fornecimento energético no fim da gravidez (Egan; Dow; Vella, 2020). No entanto, são observados o aumento de níveis hormonais à medida que a gestação progride, destacando-se estrogênio, progesterona, lactogênio placentário, hormônio de crescimento e leptina, causando um estado de resistência à insulina (Choudhury; Rajeswaris, 2021; Stern *et al.*, 2021).

Em razão da resistência à insulina, há também o acréscimo de produção endógena de glicose e lipólise no tecido adiposo, aumentando níveis glicêmicos e ácidos graxos séricos (Accioly; Saunders; Lacerda, 2002; Wang *et al.*, 2016). Por isso, alterações na glicemia e no perfil lipídico em gestações saudáveis também são comuns em virtude das alterações metabólicas particulares da fase.

O diabetes gestacional é desenvolvido pela incapacidade pancreática de produzir insulina de modo que atenua as consequências geradas pela resistência à insulina, desenvolvendo quadros hiperglicêmicos (Khalafallah *et al.*, 2016). Quando as células β perdem a capacidade de responder ao aumento da glicose sanguínea produzindo insulina e secretando de forma satisfatória, se classifica como disfunção de células β (Plows *et al.*, 2018).

Portanto, a disfunção das células β pancreáticas é um dos fatores que acarretam o desenvolvimento de DMG, de modo que, tal disfunção pode ocorrer em diversas fases do processo de produção e sinalização da insulina: síntese de pró-insulina, variações na transdução de sinais na célula e detecção dos níveis glicêmicos. Sharma e colaboradores (2022) observaram que a taxa de absorção tecidual da glicose é reduzida em torno de 54% em mulheres com DMG quando comparadas com gestantes saudáveis. Além disso, o excesso de glicose sérica pode gerar glicotoxicidade e resultar na apoptose das células β ao longo do tempo (Ashcroft *et al.*, 2017). Uma vez expressa a disfunção das células β , fomenta-se um ciclo ininterrupto de hiperglicemia, resistência à insulina e disfunção adicional das células β (Plows *et al.*, 2018).

Com o surgimento ou aumento da resistência à insulina em gestantes, a abundância de receptores de insulina no organismo pode não ser afetada, entretanto, a redução de tirosina ou o aumento da fosforilação de serina/treonina do receptor de insulina podem prejudicar a efetividade da sinalização insulínica (Plows *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2022).

Parsons, Brelje e Sorenson (1992) evidenciaram de forma inédita utilizando o modelo animal, que ocorre hipertrofia e hiperplasia das células β pancreáticas antes de haver resistência insulínica, e consequentemente o aumento da secreção de insulina estimulada pelos níveis altos de glicose sanguínea ocorre. Ao longo dos anos, outros estudos corroboraram essa mudança fisiológica na gestação, capaz de controlar a glicemia (Garrison, 2015; Ruiz-Otero; Tessem; Banerjee, 2024; Shrivastava *et al.*, 2021; Usman *et al.*, 2023).

Também é observado o aumento da produção de adipocinas em decorrência da resistência à insulina, as quais podem ser consideradas relevantes para o desenvolvimento da DMG, contribuindo para desfechos adversos na gravidez (Al-Badri; Zantout; Azar, 2015; Mierzyński, 2019). A leptina, por exemplo, uma adipocina que se encontra em níveis elevados na DMG, age interferindo no crescimento saudável do feto, fazendo com que haja uma intensificação no peso tanto da placenta quanto do feto em formação, tornando-o macrossômico (Pérez-Pérez *et al.*, 2020). Além disso, em casos de superexpressão da leptina pode-se levar à ingestão alimentar desregulada e favorecer a obesidade materna, como também demandar mais produção de insulina pelo pâncreas, resultando em hiperinsulinemia (Fasshauer; Blüher; Stumvoll, 2014; Sharma *et al.*, 2022).

2.1.2 Efeitos do diabetes mellitus gestacional na prole

Os estudos realizados pela DOHaD (Conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e das Doenças) ao longo dos anos permitiram avanços na compreensão de ambientes gestacionais desfavoráveis e a repercussão de tais condições no desenvolvimento e saúde fetal ao longo da vida, tendo como pioneiro o epidemiologista David James Porslove Barker (DOHaD Brasil, 2024). A exposição aos diversos fatores, a exemplo de metabólitos, hormônios, fármacos, alterações nutricionais, seja durante a vida intrauterina ou na infância, podem exercer impactos na saúde ou doença (DOHaD Brasil, 2024).

Freikel (1980) havia gerado a hipótese de que um ambiente intrauterino com alta exposição de nutrientes caracterizada como super nutrição, como acontece em casos de DMG, poderia ser classificada como “teratogênico mediado por combustível”, resultando alterações nos processos de diferenciações celulares e formação de órgãos, e, consequentemente, nas funções metabólicas. Essa hipótese vem sendo confirmada ao longo dos anos e o aumento do risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas como obesidade e diabetes mellitus na vida adulta é evidenciado em diferentes estudos atuais (Bowers *et al.*, 2021; Francis *et al.*, 2024; Negrato *et al.*, 2022; Chu; Godfrey, 2020; Sinha; Walker; Sen, 2021; Lizárraga; García-Gasca, 2021; Golic *et al.*, 2018; Tocantins *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2021).

Um ambiente intrauterino hiperglicêmico para o bebê pode causar repercussões negativas a curto prazo, como macrosomia, distócia de ombros, risco de hipoglicemia que, caso não seja controlado, pode causar lesões cerebrais, aumento do risco de nado-morto, assim como risco de desenvolver obesidade infantil (Gascho *et al.*, 2017; Karkia *et al.*, 2023; Scifres *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2022a).

Além disso, a hiperglicemia materna possibilita o aumento do transporte placentário de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, induzindo uma produção fetal exacerbada de insulina chamada de hiperinsulinemia fetal, contribuindo para a disfunção das células β pancreáticas e resistência à insulina no feto (Plows *et al.*, 2018). A insulina é um importante hormônio para o feto, pois possibilita o seu crescimento e desenvolvimento. Entretanto, o excesso de insulina pode resultar no crescimento fetal exacerbado, sendo chamado de macrosomia fetal (Mitanech *et al.*, 2015).

Nesse contexto, as principais malformações decorrentes da hiperglicemia materna são observadas no sistema cardíaco, renal, nervoso central e músculo esquelético fetal (Mitanech, 2010). Alterações na vasculatura feto-placentária em mulheres acometidas pelo DMG podem causar alterações vasculares fetais, que levam à distúrbios metabólicos (Sharma *et al.*, 2022). Mecanismos relacionados à apoptose celular e estresse oxidativo aumentados estão relacionados com a origem de algumas malformações, agindo através de vias como Ask1, JNK1/2, FoxO3a e caspase-8 (Yang *et al.*, 2015; Wang; Reece; Yang, 2015; Mitanech *et al.*, 2015), no entanto, os mecanismos pelos quais a DMG está relacionada com determinadas alterações fisiológicas fetais e o desenvolvimento de doenças ainda não é bem esclarecido (Mitanech *et al.*, 2015).

Uma revisão sistemática e meta-análise avaliou 13 estudos de coorte no intuito de observar a repercussão da DMG na pressão arterial da prole como risco de hipertensão

arterial e doenças cardiovasculares. Os resultados mostraram que, de acordo com as análises considerando o sexo, a influência do DMG foi significativa para mudanças na pressão arterial diastólica e sistólica em descendentes masculinos, mas não em descendentes femininos (Aceti *et al.*, 2012). Entretanto, não há muitos estudos envolvendo humanos e a investigação sobre DMG e pressão arterial na prole para obtenção de um conhecimento mais aprofundado sobre o tema.

No contexto das alterações cardiovasculares, foi observado que bebês nascidos de mães com hiperglicemia e hiperinsulinemia são mais suscetíveis à miocardiopatia hipertrófica. Tal risco também é existente para gestantes que possuem diabetes mellitus tipo 1 ou 2 (Ullmo *et al.*, 2007). Outros desfechos adversos de curto prazo em neonatos nascidos de mães com DMG são, síndrome do desconforto respiratório neonatal, restrição de crescimento intrauterino, morte perinatal, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia (Mitanchez *et al.*, 2015).

O estudo observacional e prospectivo de acompanhamento de hiperglicemia e resultados adversos na gravidez (HAPO) avaliou 4.160 crianças com idades entre 10 e 14 anos, no qual constataram que filhos de mães que tiveram DMG não tratada apresentaram maior peso, maiores medidas nas dobras cutâneas, resistência insulínica e menor compensação de células β como resposta à resistência à insulina, bem como menor secreção de insulina (Lowe *et al.*, 2019).

Em um estudo utilizando ratas Sprague-Dawley alimentadas com dieta rica em gordura e sacarose foi observado aumento de peso significativo na prole dessas ratas, apresentando maior massa gorda e porcentagem de gordura corporal na época do desmame em comparação com a prole de ratas que receberam suplemento de oligofrutose e sacarose (Paul *et al.*, 2016). Os achados encontrados nesses estudos são de relevância, visto que revelam o aumento do risco da prole desenvolver doenças crônicas relacionadas ao metabolismo de glicose e insulina como diabetes mellitus e obesidade no período da puberdade.

2.2 DISBIOSE INTESTINAL NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

A microbiota intestinal (MI) é formada por um conjunto de microrganismos que exercem funções metabólicas e imunológicas essenciais para a saúde (Rinninella *et al.*, 2019). Constata-se que os filos de bactérias dominantes na microbiota intestinal são os Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota, Proteobacteria, Fusobacteriota e

Verrucomicrobiota , de modo que os Firmicutes e Bacteroidota abrangem 90% da totalidade (Arumugam *et al.*, 2011).

Mudanças ocorrem na microbiota intestinal em decorrência da fase de vida, fatores ambientais, hábitos alimentares e uso de antibióticos (Rinninella *et al.*, 2019). Além desses fatores, a gestação se caracteriza como um momento de mudanças não apenas hormonais e metabólicas, como também na MI como ajuste fisiológico (Ionescu *et al.*, 2022). Alguns estudos evidenciaram que o estrogênio e a progesterona, hormônios que estão em concentrações elevadas no período gravídico, fazem parte dos fatores que podem alterar a MI durante essa fase (Fujiwara *et al.*, 2015; Nuriel-Ohayon; Neuman; Koren, 2016). Em gestações saudáveis, tem sido observado que desde o primeiro trimestre já existem mudanças na MI, sendo caracterizada pela redução da β diversidade e aumento da α diversidade (Koren *et al.*, 2012; Ponzo *et al.*, 2019), além de haver predominância de Firmicutes, Bacteroidota, *Clostridiales*, *Akkermansia* e *Bifidobacterium*, microrganismos degradadores de mucina (Gohir *et al.*, 2015).

Apesar das mudanças na MI materna serem consideradas adaptações fisiológicas particulares da gravidez, vários elementos como obesidade, dieta ocidentalizada, estilo de vida sedentário e ganho excessivo de peso, podem afetar a composição e diversidade dos microrganismos intestinais, resultando em quadros de disbiose intestinal (Ziętek *et al.*, 2021).

A MI de gestantes saudáveis e gestantes com DMG foi examinada para investigar a possível contribuição da disbiose intestinal na fisiopatologia do DMG. Mulheres diagnosticadas com DMG apresentam uma redução na diversidade α em comparação com gestantes normoglicêmicas. Essa redução está relacionada com níveis glicêmicos mais elevados (Kuang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Na revisão sistemática realizada por Huang e colaboradores (2021), 50% dos estudos analisados demonstraram a manifestação de disbiose intestinal caracterizada pela alteração na diversidade α , aumento de bactérias gram-negativas no DMG, bem como a diminuição de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de atividades probióticas. Wang *et al.* (2020) realizaram a comparação da MI de gestantes normoglicêmicas e com DMG, verificando que houve baixo índice de diversidade filogenética das pacientes com DMG.

Além disso, há aumento de bactérias gram-negativas entre o segundo e terceiro trimestre, principalmente Parabacteroides, Prevotella, Haemophilus e Desulfovibrio (Kuang *et al.*, 2017; Cortez *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Ye *et al.* (2019) observaram o

enriquecimento de outras espécies como *Blautia* e *Eubacterium_hallii_group* em gestantes com DMG. Esses microrganismos tem sido associados positivamente ao aumento da glicemia (Ye *et al.*, 2019). A maior abundância de *Blautia* na MI foi observada em indivíduos com alto índice de massa corporal e intolerância à glicose (Eghsatyan *et al.*, 2016; Ottosson *et al.*, 2018).

A diminuição na abundância de *Faecalibacterium*, um produtor de AGCC, foi relacionada aos níveis aumentados de glicose no sangue e mostrou uma correlação inversa com a glicemia em jejum em mulheres com DMG (Ye *et al.*, 2019; Rivière *et al.*, 2016; Ferrocino *et al.*, 2018). A maior abundância relativa do gênero *Collinsella* em mulheres com DMG foi diretamente associada aos níveis de insulina e HOMA-IR (Ferrocino *et al.*, 2018). Essas alterações podem indicar que *Blautia*, *Eubacterium_hallii_group*, *Faecalibacterium* e *Collinsella* são indicadores relevantes de disbiose intestinal em mulheres com DMG.

Mesmo diante dos resultados evidenciados através dos estudos de que a MI é alterada em mulheres diagnosticadas com DMG, ainda não é entendido se a disbiose intestinal se caracteriza como uma das causas ou consequência dessa patologia (Rold *et al.*, 2022). Apesar disso, estudos tem demonstrado a contribuição da disbiose intestinal na desregulação do metabolismo da glicose e insulina em mulheres com DMG (Lappas *et al.*, 2011; Pantham; Aye; Powell, 2015; Hasain *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2022b).

O estresse oxidativo e a inflamação são processos comuns à implantação do embrião e desenvolvimento do feto e placenta, visto que essa fase requer altos níveis de oxigênio (Lappas *et al.*, 2011; Pantham; Aye; Powell, 2015; Plows *et al.*, 2018; McIntyre *et al.*, 2019). Entretanto, produções excessivas de radicais livres podem desequilibrar o sistema antioxidante, causando danos oxidativos celulares e gerando consequências às mulheres com diabetes gestacional. Desse modo, a disbiose intestinal pode ser um importante contribuinte no aumento da produção de radicais livres e mediadores inflamatórios (Ramiro-Cortijo *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2018; Mendonça *et al.*, 2022).

Nos casos de mulheres com DMG, a hiperglicemia contribui para o estresse oxidativo de forma que auxilia no desenvolvimento precoce do feto, além de gerar alterações a nível celular podendo modificar expressão gênica e promover danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico) (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Karamali *et al.*, 2016).

O estudo realizado por Mendonça e colaboradores (2022) avalia que disbiose na microbiota intestinal pode ser um fator potencial que aumenta o nível de estresse oxidativo e inflamação em mulheres com diabetes gestacional. Alguns estudos

observaram o aumento de biomarcadores de estresse oxidativo em mulheres com DMG no plasma e soro materno, bem como no plasma do cordão umbilical (Murthy *et al.* 2018; Shang; Dong; Hou, 2018; Zhang *et al.* 2019). Um estudo realizado por López-Tinoco e colaboradores (2011) observaram uma redução da defesa do sistema antioxidante de mulheres com DMG quando comparados com gestantes sem DMG, com redução de glutathione transferase, xantina oxidase, superóxido dismutase.

Além do estresse oxidativo, a inflamação mediada pela disbiose intestinal também possui uma estreita relação com resistência insulínica no DMG (De Albuquerque Lemos; De Brito Alves; Souza, 2024). Uma pesquisa recente relata que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias com IL-6, IL-8, TNF- α , redução de AGCC, sobretudo butirato, bem como alterações na composição da MI foram observadas em mulheres que desenvolveram DMG (Pinto *et al.*, 2023).

Um dos desdobramentos da disbiose intestinal é a inflamação causada pelo LPS, lipopolissacarídeo presente nas bactérias gram-negativas, que quando em excesso, entram na corrente sanguínea e se tornam mensageiros químicos para ativação de vias inflamatórias como NF- κ B, JNK e IKK- β , que contribuem para a produção de citocinas inflamatórias em vários órgãos como tecido adiposo, fígado, músculo, e sobretudo pâncreas. Outros fatores que auxiliam na translocação do LPS para a corrente sanguínea são a diminuição da integridade da barreira intestinal, caracterizada pela diminuição de proteínas de junção, e a diminuição da produção de AGCC (Meijnikman *et al.*, 2017; Sircana *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2022; Oral *et al.*, 2022; Hasain *et al.*, 2020).

A presença de citocinas inflamatórias no pâncreas pode reduzir a produção insulínica, tendo como principal causa a apoptose das células β pancreáticas. Nos tecidos muscular e adiposo, a resistência à insulina é um dos efeitos decorrentes da inflamação. Esses fatores estão intimamente aliados à hiperglicemia e são relatados como um dos mecanismos e alterações em mulheres com DMG (De Albuquerque Lemos; De Brito Alves; Souza, 2024). Dessa forma, os marcadores inflamatórios podem ter o potencial de servir como preditores para diagnóstico precoce. Nesse contexto, medidas preventivas e terapêuticas alternativas podem ser eficazes visando promover saúde intestinal, tendo como alvo a modulação da MI e sua repercussão nos parâmetros glicêmicos e desfechos da gestação (Chen *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2021; Homayouni *et al.*, 2020; Kamińska *et al.*, 2022).

2.3 USO DE PROBIÓTICOS E NUTRACÊUTICOS COMO TERAPIA ADJUVANTE NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (Zajdenverg *et al.*, 2022a) o tratamento do DMG consiste na orientação nutricional de forma individualizada aliada à atividade física. Em situações de incapacidade do controle glicêmico efetivo decorrentes das mudanças no estilo de vida a terapia farmacológica é indicada, sendo a insulina a primeira opção farmacológica de tratamento. Entretanto, os pesquisadores tem se empenhado em desenvolver terapias alternativas para o manejo do DMG visando diminuir os impactos na saúde do binômio mãe- bebê, visto que a utilização de hipoglicemiantes na fase gestacional é limitada, a exemplo da metformina e gliburida que podem ultrapassar a placenta (Mendonça *et al.*, 2022; Sotiriades; Chatzaki; Cavoretto, 2021). Além disso, exposição intrauterina a longo prazo de hipoglicemiantes ainda não é bem elucidado na literatura (Johns *et al.*, 2018).

Nesse contexto, os nutracêuticos vem sendo avaliados em diversas condições clínicas como alternativa terapêutica adjuvante, promovendo melhora nos parâmetros de saúde e bem estar dos indivíduos (Senesi *et al.*, 2021; Magni; Baragetti; Poli, 2022; Isola, 2020; Colletti; Cicero, 2021; Martin *et al.*, 2022; Nehmi-Filho *et al.*, 2023). O conceito de “nutracêuticos” foi estabelecido inicialmente em 1989 como “alimentos ou partes de alimentos que fornecem benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças” (Das *et al.*, 2011; Aronson, 2016). Apesar de ainda não haver um consenso internacional atual sobre o conceito de “nutracêuticos”, a Associação Europeia de Nutracêuticos (2016) define o termo como “produtos nutricionais que proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças”.

Nesse contexto, os nutracêuticos são caracterizados por serem compostos concentrados utilizados com a finalidade de prevenir doenças crônicas, reduzir sintomas e gerir condições subclínicas, conferindo suporte à estrutura e funções corporais (Associação Europeia de Nutracêuticos, 2016). Mediante a isso, compostos bioativos e probióticos tem sido considerados como nutracêuticos quando apresentados em uma formulação farmacêutica adequada que demonstre potencial para causar efeitos benéficos na saúde do consumidor, tornando-se essencial a prescrição por profissional qualificado com devido acompanhamento (Sampaio *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023).

O termo “probiótico” é definido como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”

(Hill *et al.*, 2014). Seu consumo na gestação já é demonstrado seguro, sem efeitos adversos e demonstra repercussões positivas no controle glicêmico de mulheres diagnosticadas com DMG, tendo maior aplicação clínica os probióticos do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (De Albuquerque Lemos; De Brito Alves; Souza, 2024).

Tem sido demonstrado que a suplementação com probióticos é capaz de modular a MI, conferindo benefícios ao ambiente intestinal como aumento da produção de AGCC, restauração da integridade da barreira intestinal, diminuição da translocação de LPS, resultando na redução de citocinas inflamatórias, biomarcadores de estresse oxidativo, além de melhora nos parâmetros no perfil lipídico, sensibilidade à insulina, glicemia em jejum e HOMA-IR em mulheres com DMG (Kijmanawat *et al.*, 2018; Jamilian; Amirani; Asemi, 2019; Hajifaraji *et al.*, 2018).

Nesse contexto, cepas com potencial probiótico nomeadas de *Limosillactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) 139, *L. fermentum* 263, *L. fermentum* 296, isoladas de frutas tropicais, a saber, manga, abacaxi e morango, respectivamente, vem sendo testadas em estudos *in vitro* e experimentais pois demonstraram a capacidade de modular a MI e causar benefícios ao hospedeiro (Garcia *et al.*, 2016; De Albuquerque *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2022; Cavalcante *et al.*, 2019; De Luna Freire *et al.*, 2021a). A avaliação do consumo dessas cepas foi realizada em modelo animal, de modo que, nenhum efeito adverso, sinais ou sintomas de toxicidade foram observados (Cruz Neto *et al.*, 2023).

Curiosamente, essas cepas tem mostrado efeitos benéficos no metabolismo lipídico, como também no metabolismo da glicose. No estudo realizado por Oliveira *et al.* (2020), os autores avaliaram os benefícios da formulação probiótica contendo as três cepas de *L. fermentum* (139, 263, 296) (1×10^9 UFC/mL de cada cepa) na prole de ratas com dislipidemia materna. Após oito semanas de tratamento foi observada a melhora no perfil lipídico e disfunção autonômica nos descendentes femininos e masculinos, sendo evidenciados na melhora da pressão arterial, tônus simpático, redução de colesterol total. Em outros estudos, foi observado que a administração da formulação nutracêutica (*L. fermentum* 139, 263 e 296 - 1×10^9 UFC/mL de cada cepa) por quatro semanas reduziu significativamente os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL-colesterol em fêmeas e machos alimentados com dieta rica em gordura (De Luna Freire *et al.*, 2021a; De Luna Freire *et al.*, 2021b).

Os compostos fenólicos são conhecidos por possuírem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, além de exercerem benefícios locais e sistêmicos à medida que

perpassam o trato gastrointestinal e são absorvidos, prevenindo o surgimento de doenças como obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Cueva *et al.*, 2017; Farhadi *et al.*, 2016; Zhang; Tsao, 2016). A apresentação de formulações nutracêuticas contendo compostos bioativos associados aos probióticos tem sido exploradas dada a interação dos compostos fenólicos e microrganismos benéficos, atuando de forma positiva na modulação e saúde intestinal (Souza *et al.*, 2018). As cepas probióticas são capazes de melhorar o metabolismo dos compostos fenólicos, ao passo que os compostos fenólicos conferem proteção aos probióticos ao longo do sistema digestório e em matrizes alimentares (Souza *et al.*, 2018). Por isso, a combinação de formulações probióticas com compostos fenólicos se torna uma estratégia notável e inovadora, necessitando realizar estudos para avaliar os efeitos desses produtos na saúde humana.

A jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] é uma espécie nativa da Mata Atlântica brasileira e apresenta uma riqueza nutricional, especialmente de compostos fenólicos. A casca da jabuticaba é rica em fibras e compostos fenólicos, sobretudo antocianinas, como por exemplo cianidina e delphinidina (Silva *et al.*, 2023). Nesse contexto, estudos prévios foram realizados avaliando o potencial prebiótico do subproduto da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), demonstrando a capacidade de utilização abundante dos compostos fenólicos pela microbiota intestinal e de modular a composição da microbiota intestinal por meio do estímulo ao crescimento e metabolismo de microrganismos probióticos como os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e aumento da produção de AGCC, além de diminuir a abundância de *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp., *Eubacterium rectale*/*Clostridium coccoides* e *C. histolyticum*, obtendo índices prebióticos positivos (8,61–11,92). (Massa *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2022).

Por ser um fruto de alta perecibilidade, a liofilização da casca da jabuticaba possibilita estabilidade ao produto e a preservação dos seus compostos nutricionais, de modo que o pó da casca da jabuticaba pode ter aplicabilidades na indústria alimentícia e farmacêutica como constituinte de formulações nutracêuticas (Silva *et al.*, 2023; Benvenuti; Zielinski; Ferreira, 2021). Visando os benefícios à saúde a partir do consumo de probióticos e prebióticos, foi desenvolvido um nutracêutico composto pelo liofilizado de cepas *L. fermentum* (139, 263 e 296) e casca de jabuticaba (Silva *et al.*, 2023). A estabilidade da formulação nutracêutica foi recentemente investigada sob condições de armazenamento, de modo que foi constatada a permanência de atividade antioxidante e composição de compostos fenólicos durante 90 dias de armazenamento,

apresentando maior estabilidade e funcionalidade sob refrigeração relacionados às altas contagens de células probióticas viáveis (Nascimento *et al.*, 2024). Mediante esses resultados, esta formulação nutracêutica se torna um produto de grande valor agregado com o potencial de gerar efeitos benéficos ao organismo.

Ainda é escasso estudos avaliando os efeitos da suplementação dos subprodutos desse fruto na saúde e doença, porém, há alguns estudos que evidenciam benefícios do consumo da casca da jabuticaba ou do liofilizado da casca desse fruto. No estudo realizado por Quatrin e colaboradores (2018) foi demonstrado que o pó da casca da jabuticaba na dose máxima (10,8g/L na água potável por oito semanas) diminuiu significativamente os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, LDL-colesterol, VLDL (lipoproteína de muita baixa densidade), além de citocinas inflamatórias como TNF- α , como também diminuiu complicações hepáticas, melhorou sinalização de insulina e diminuição resistência insulínica em ratos com diabetes mellitus tipo 2.

A redução da resistência à insulina e diminuição de citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-6 foram observados em camundongos com obesidade induzida por dieta que foram tratados com o pó da casca de jabuticaba (1, 2 ou 4% p/p) por seis semanas (Dragano *et al.*, 2013). Achados semelhantes foram encontrados por Lenquiste e colaboradores (2012), demonstrando a redução de insulina sérica e HOMA-IR em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em gordura suplementada com pó da casca de jabuticaba (1, 2 ou 4% p/p) durante seis semanas.

Outras descobertas provenientes dos efeitos da suplementação da casca da jabuticaba estão a melhora da defesa antioxidante, redução da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição de biomarcadores inflamatórios, além de possuir propriedades antiproliferativa contra células leucêmicas (Batista *et al.*, 2014; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2011).

Visando os benefícios encontrados na literatura científica das cepas potencialmente probióticas de *L. fermentum* e do liofilizado da casca de jabuticaba, torna-se pertinente avaliar os efeitos de uma formulação nutracêutica contendo esses componentes, seu impacto na saúde intestinal e resultados sistêmicos indiretos (Silva *et al.*, 2023).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio pré-clínico fase I, que avaliou a capacidade do nutracêutico na melhora de parâmetros glicêmicos, tolerância à glicose, perfil lipídico, e biomarcadores inflamatórios a partir da modulação da microbiota intestinal em ratas com DMG e as repercussões na saúde cardiometabólica da prole.

3.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizadas 36 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com sessenta dias de vida. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno, com água filtrada e ração *ad libitum*, mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($55 \pm 10\%$). O projeto foi submetido ao Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) tendo como parecer aprovado (Nº 2218270124), seguindo as recomendações do Conselho Nacional para Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e dos Princípios Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais.

3.3 ELABORAÇÃO DO NUTRACÊUTICO

O nutracêutico é composto pelo liofilizado de cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*), sendo elas *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296, casca de jaboticaba e fruto-oligossacarídeo (FOS) (20% p/v) (SILVA *et al.*, 2023; Nascimento *et al.*, 2024). O nutracêutico foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil).

As amostras de jaboticaba cultivar Sabará, espécie *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg foram coletadas em três lotes de uma fazenda privada (Areia, Paraíba, Brasil), selecionadas, higienizadas com hipoclorito de sódio e despolpadas. As cascas foram separadas, congeladas (-20°C) e liofilizadas à -56°C (Liotop, São Paulo, SP, Brasil; temperatura $-56 \pm 2^\circ\text{C}$, pressão de vácuo $< 170\ \mu\text{Hg}$, velocidade de liofilização $1\ \text{mm/h}$, 20 h). Após a liofilização, as cascas desidratadas foram trituradas, peneiradas e

acondicionadas em sacos metalizados, hermeticamente selados e armazenado sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) (Silva *et al.*, 2023).

As cepas bacterianas consideradas potencialmente probióticas de *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 – foram isoladas de frutas, a saber, manga, abacaxi e morango, respectivamente (Garcia *et al.*, 2016). Os estoques foram mantidos ($-20 \pm 0,5$ °C) em criotubos estéreis com caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) com glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA; 1:5, v/v). As culturas de trabalho foram mantidas ($4 \pm 0,5$ °C) aerobicamente em ágar MRS (HiMedia). Cada cepa foi cultivada (37 °C, 20–24 h) anaerobicamente em caldo MRS (AnaeroGen, Oxoid Anaerogen Anaerobic System, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) e centrifugada por 10 minutos ($1696 \times g$, 4 °C), lavada duas vezes com solução salina estéril (NaCl, 0,85%, p/v). Posteriormente foi ressuspensa em água destilada estéril e misturada em proporções iguais (1:1:1, v/v) para obter uma suspensão de células com uma leitura de densidade óptica a 625 nm de 2,5 e contagens de células viáveis de aproximadamente 11 log UFC/mL (Silva *et al.*, 2023).

Para a preparação do nutracêutico foi adicionada água destilada à suspensão mista das cepas de *L. fermentum* juntamente com o liofilizado da casca de jabuticaba e FOS (20% p/v), importante crioprotetor para células bacterianas. Logo em seguida foram congeladas por 24 horas a -80 °C e liofilizadas por 30 horas com um liofilizador de bancada (Liotop, Modelo L-101; temperatura -56 ± 2 °C, pressão de vácuo < 170 µHg, velocidade de liofilização 1 mm/h). Após a liofilização, as contagens de células viáveis foram reduzidas, entretanto, permaneceram elevadas ($11,15 \pm 0,15$ log UFC/g) (Silva *et al.*, 2023). As formulações foram armazenadas sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e proteção da luz até o momento da administração (Silva *et al.*, 2023).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: (i) grupo controle (CTL, n=12), que recebeu uma dieta controle preparada de acordo com o American Institute of Nutrition - AIN-93 M (Tabela 1); (ii) grupo diabetes gestacional + veículo (GDM, n=12); e (iii) grupo diabetes gestacional + nutracêutico (GDM+Nut, n=12). Os grupos GDM e GDM+Nut receberam dieta dislipidêmica, adquirida da empresa Rhoster (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil) (Tabela 1) a partir dos 60 dias de vida até o término do

experimento. A solução de sacarose a 20% também foi ofertada para os grupos GDM e GDM+Nut durante as 6 semanas que antecederam o acasalamento.

Tabela 1. Composição da dieta controle e dislipidêmica.

Ingredientes (g/100g)	Dietas	
	Controle (AIN-93M)*	Dislipidêmica**
Amido de milho	39.75	33.09
Amido de milho dextrinizado	13.20	15.50
Caseína [#]	20.00	19.86
Sacarose	10.00	6.00
Óleo de soja	7.00	3.00
Gordura animal (banha)	0.00	6.00
Gordura vegetal não hidrolisada	0.00	5.00
Colesterol (Sigma)	0.00	1.00
Ácido cólico (Sigma)	0.00	0.50
Celulose	5.00	5.00
Mix de Mineral 93M	3.50	3.50
Mix de Vitaminas	1.00	1.00
L-cistina	0.30	0.30
Bitartarato de colina	0.25	0.25
t-BHQ ***	0.014	0.014
Composição nutricional		
Calorias (Kj/100 g)	16.46	18.05
Carboidrato (%)	63.8	50.5
Proteína (%)	20.3	18.3
Lípido (%)	15.9	31.2

* Adaptado de Reeves et al. (1993). ** Rhoster. *** t-BHQ: Tert-Butil-hidroquinona. [#] Caseína apresentou 85% de pureza (85 g de proteína para cada 100 g de caseína).

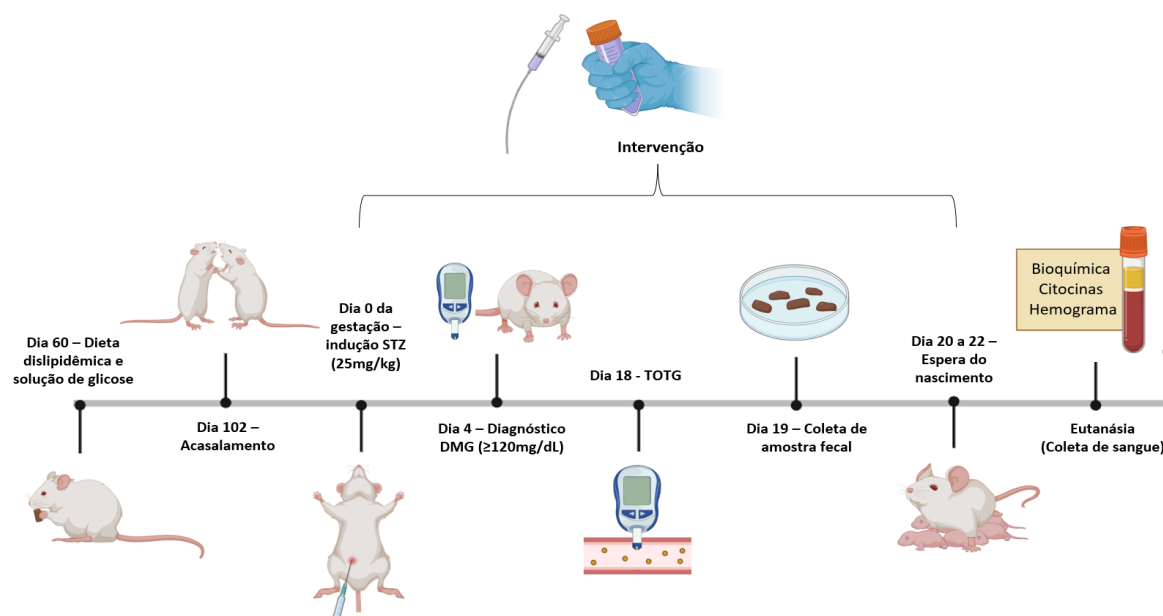
Após as 6 semanas de dieta (105 dias de vida) as fêmeas foram postas para o acasalamento na proporção de um macho para uma fêmea. Diariamente foi feito o esfregaço vaginal para a confirmação da gravidez, de forma que, o aparecimento de espermatozoides ou de um tampão de muco observado por meio de microscopia, sugeriu o sucesso do acasalamento e início da fase gestacional, considerado dia 0 da gestação. Após uma semana do início do acasalamento, as ratas que não estavam grávidas foram excluídas do estudo.

No dia 0 da gestação, após o jejum de 10 horas foi administrada via intraperitoneal uma dose única de estreptozotocina (Cayman Chemical Company) (STZ - 25mg/kg diluído em tampão citrato pH 4,5) para induzir hiperglicemia. O diagnóstico foi confirmado 72 horas após a administração da indução quando se constatou valor glicêmico igual ou maior que 120mg/dL através da recolha de uma gota de sangue utilizando um medidor de glicose (ACCU-CHEK, Roche, Alemanha) (Xu *et al.*, 2020).

A solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi administrada como veículo no grupo GDM. No grupo GDM+Nut, 2,5mL (2g/kg) da formulação contendo o nutracêutico foi administrada duas vezes ao dia. A administração do veículo e do nutracêutico foi realizada por gavagem orogástrica durante toda a gestação.

O peso corporal e consumo alimentar foram avaliados durante todo o experimento utilizando a balança de laboratório semi-analítica (PFB 6000-0M - KERN & SOHN). Além disso, durante a gestação também foi realizado teste de tolerância à glicose e coleta de fezes para avaliação da microbiota intestinal. As ratas foram eutanasiadas por overdose anestésica utilizando pentobarbital sódico (180mg/kg) via intraperitoneal e o sangue foi coletado para hemograma e soro para avaliação bioquímica e de citocinas (Figura 1).

Figura 1. Desenho Experimental das Ratas Wistar gestantes.

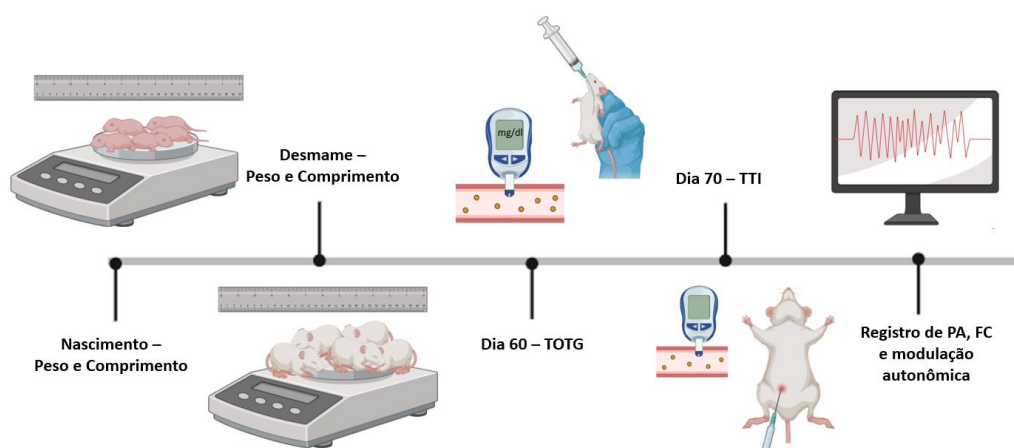


Fonte: Autora, 2024.

O experimento ocorreu em duas etapas. A primeira etapa foi conduzida conforme demonstrado na Figura 1. Enquanto que, na segunda etapa, as mesmas análises foram conduzidas, até a data de nascimento. Após o nascimento o tratamento materno com o nutracêutico foi suspenso no intuito de reduzir o manuseio para que não houvesse rejeição de filhotes, tornando possível a observação da prole ao longo do tempo e a realização das análises descritas a seguir.

Foi realizada a avaliação do peso e comprimento da prole após o nascimento e até o final do experimento. Para isso foi utilizada uma balança semi-analítica (PFB 6000-0M - KERN & SOHN) e uma fita métrica (MedCenter®). Para representar a prole de cada grupo, as ninhadas foram reduzidas, escolhendo aleatoriamente oito machos e oito fêmeas de acordo com seus respectivos grupos OCTL, OGDM e OGDM+Nut. Aos 60 dias de vida foi realizado o teste oral de tolerância à glicose, e após 72 horas o teste de tolerância à insulina. Ao atingirem a idade entre 70 e 80 dias de vida, a prole foi submetida à cirurgia de implantação de cateteres vasculares no intuito de registrar a pressão arterial, frequência cardíaca e avaliar a função autonômica. Após isso, os ratos foram eutanasiados por overdose anestésica utilizando pentobarbital sódico (180mg/kg) via intraperitoneal (Figura 2).

Figura 2. Desenho Experimental da Prole.



Fonte: Autora, 2024.

3.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

No décimo oitavo dia de gestação foi efetuado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) nas mães. As ratas foram submetidas ao jejum de 6 horas antes da administração da solução de glicose (2 g/kg de peso corporal; solução a 200 g/l) por gavagem orogástrica. Foram colhidas amostras de sangue da ponta da cauda a 0 (linha de base), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose (Cavalcante *et al.*, 2019). Os níveis séricos de glicose foram medidos através da recolha de uma gota de sangue utilizando um

medidor de glicose (ACCU-CHEK, Roche, Alemanha). Este mesmo procedimento foi realizado com a prole aos 60 dias de vida.

3.6 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

As amostras fecais foram coletadas no 19º dia de gestação. As amostras fecais foram imediatamente colocadas em tubos EP estéreis para congelamento rápido e, em seguida, transferidas para um refrigerador a -80°C para armazenamento até a extração do DNA. O DNA foi extraído usando um método exclusivo de esferas magnéticas (Neopropecta Microbiome Technologies, SC, Brasil). A preparação da biblioteca foi realizada usando o protocolo NGS da Neopropecta. A diversidade bacteriana foi avaliada pelo sequenciamento de alto rendimento da região 16S rRNA V3/V4 usando os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) utilizando a rarefação de 10 mil leituras. As bibliotecas foram quantificadas usando o sistema fluorométrico Qubit e por qPCR a partir de curvas padrão usando o Colibri Library Quantification Kit (Invitrogen, EUA). Em seguida, as amostras foram sequenciadas usando o kit NextSeq P1 600-cycle com reações de extremidade emparelhadas de 2 x 305 bp. Após o sequenciamento, as sequências foram analisadas usando um pipeline (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, as sequências foram demultiplexadas e submetidas a um filtro de qualidade com base na soma das probabilidades de erro das bases de DNA, permitindo um máximo de 1% de erros acumulados. Os adaptadores e primers da Illumina foram então removidos das sequências de DNA. Todos os dados de sequenciação de amplicons de 16s rRNA Illumina fornecidos neste estudo podem ser obtidos publicamente no Sequence Read Archive (SRA) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) com o número de acesso PRJNA1200614.

3.7 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Os parâmetros hematológicos avaliados nas mães foram eritrograma (contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, concentração de hemoglobina). Os métodos utilizados para as análises citadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Métodos utilizados para as análises hematológicas.

Análise	Método
Contagem de hemácias	Contagem de hemácias na câmara de Neubauer
Dosagem de hemoglobina	Cianometemoglobina
Concentração de hemoglobina	Porcentagem da hemoglobina em 100mL de hemácias

Para análises bioquímicas, as ratas ficaram em jejum por 6 horas e as amostras de sangue foram colhidas após a eutanásia. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm (rotação por minuto). Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatina, ureia, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e colesterol LDL foram dosados. As dosagens desses parâmetros foram realizadas por meio de kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante, a partir do analisador bioquímico automático AMA-B-280 S (Ama Medical, Brasil).

3.8 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Os níveis de citocinas no soro materno, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6 e IL-10, foram determinados usando o kit Millipore 7-plex (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA). Os ensaios foram realizados em uma placa de 96 poços contendo uma membrana de filtro seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas nas amostras foram estimadas a partir de uma curva padrão usando uma equação polinomial de terceira ordem e expressas em pg/mL. Amostras abaixo do limite de detecção do ensaio foram registradas como zero, enquanto as amostras acima do limite superior da quantificação das curvas padrão foram atribuídas ao valor mais alto da curva. A leitura foi realizada em citômetro (CytoFLEX, São Paulo, Brasil) (De Luna Freire *et al.*, 2021).

3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

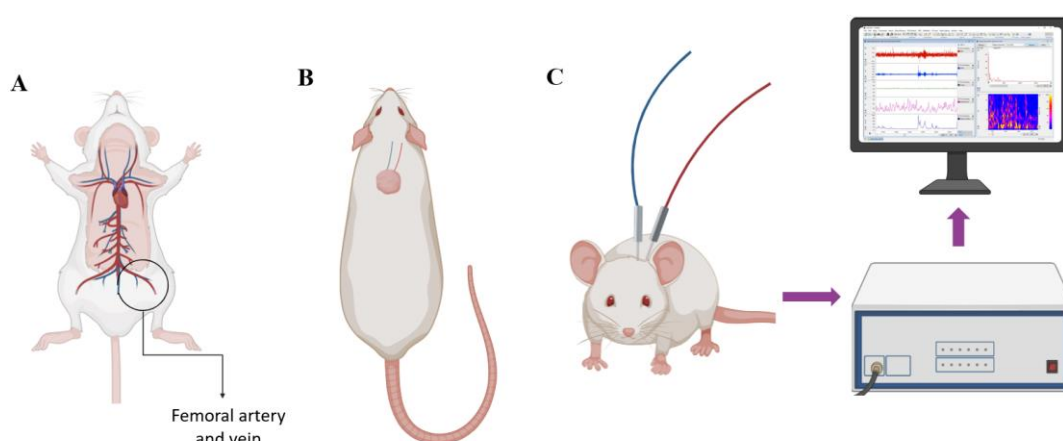
A prole foi submetida ao jejum de 6 horas para a realização do teste de tolerância à insulina. Receberam uma injeção intraperitoneal de 0,75U/kg de insulina e amostras de sangue da ponta da cauda foram recolhidas nos tempos 0 (linha de base), 15, 30, 60, 90 e 120 min. Os níveis séricos de glicose foram medidos através da coleta de uma gota de

sangue utilizando um medidor de glucose (ACCU-CHEK, Roche, Alemanha) (Cavalcante *et al.*, 2019).

3.10 IMPLANTAÇÃO DE CATETERES E REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para cirurgia de implantação dos cateteres vasculares na prole, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Em seguida, foram tricotomizados nas regiões inguinal e dorsal, e colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha cirúrgica. A região femoral foi seccionada a fim de localizar e separar a artéria e veia femoral, e logo após, cânulas de polietileno foram introduzidas na artéria femoral para mensuração da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) e veia femoral para administração de drogas vasoativas (Figura 3A). Por fim, a cânula foi exteriorizada pela região escapular dorsal do animal (Figura 3B). Os ratos foram submetidos a um período de recuperação cirúrgica por 24 horas até o início dos protocolos experimentais dos registros de PA e FC. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por 30-40 minutos em condições basais, e os valores da pressão arterial média (PAM) e FC a partir da seleção de um trecho de 5-10 minutos do registro, para cada animal (Figura 3C).

Figura 3. Técnica cirúrgica de implantação de catéteres para registro da pressão arterial e frequência cardíaca.



Fonte: Autora, 2024.

3.11 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO AUTONÔMICA E TÔNUS SIMPÁTICO

A função autonômica foi avaliada na prole através da administração de atropina (2mg/Kg), antagonista muscarínico que atua como um modulador da função parassimpática; e um β -bloqueador, denominado propranolol (10 mg/kg) com o intuito de avaliar a função autonômica simpática. Quanto à avaliação do tônus vascular simpático, foi avaliado por meio da administração de um bloqueador ganglionar, hexametônio (30 mg/kg, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) (Cavalcante *et al.*, 2019).

3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão para testes paramétricos, ANOVA de uma via e o pós-teste de Tukey. Os resultados não paramétricos foram expressos como mediana (máximo e mínimo) para teste não-paramétricos, sendo utilizado Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

As sequências das análises de microbiota intestinal foram “demultiplexadas” com o software Bcl2fastq (v2.17.1.14) e depois limpas com o cutadapt (v1.9.1). As variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram identificadas usando o Qiime2 DADA2 com uma abordagem OTU de ruído zero. Por fim, foi feita uma atribuição taxonômica com a base Greengenes-13.8-nr99. Após o sequenciamento das amostras referentes à microbiota intestinal, as sequências foram importadas para o software R (versão 4.4.1) para realização das análises estatísticas. Foram utilizados os testes estatísticos de Maaslin e Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, sendo considerada significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

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

O artigo apresentado no apêndice A intitulado “Synbiotic nutraceutical with freeze-dried jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* strains improves glycemic control, gut microbiota, and inflammation in rats with gestational diabetes and protects offspring from cardiac autonomic dysfunction later in life” aborda os efeitos da administração de uma formulação nutracêutica contendo cepas de *L. fermentum* e casca de jabuticaba na microbiota intestinal e tratamento da diabetes gestacional em ratas *Wistar*, bem como o impacto do consumo materno do nutracêutico na saúde da prole.

Os resultados desse estudo demonstraram que o grupo GDM+Nut apresentou melhora na tolerância à glicose e redução de citocinas inflamatórias séricas como TNF- α e IL-6 quando comparadas com o grupo GDM. Além disso, a administração da formulação nutracêutica aumentou a proporção de Firmicutes/Bacteroidota e beta diversidade, porém, não alterou os índices de alfa diversidade quando comparados com o grupo GDM. A administração da formulação nutracêutica foi capaz de aumentar a abundância de gêneros e famílias bacterianas da microbiota intestinal. Os efeitos da administração materna da formulação nutracêutica na prole, avaliando os parâmetros de peso e comprimento demonstraram o aumento de peso e comprimento ao nascer da prole feminina, bem como aumento do comprimento na fase de desmame e adolescência. A prole das ratas tratadas com a formulação nutracêutica não apresentaram melhora na tolerância à glicose ao comparar com a prole de ratas GDM. Entretanto, parâmetros de saúde cardiovascular da prole do grupo GDM+Nut apresentaram melhora em comparação com a prole do grupo GDM.

O artigo apresentado no apêndice B intitulado “Probiotic therapy as a promising strategy for gestational diabetes mellitus management” publicado pela revista *Expert Opinion on Biological Therapy*, teve como objetivo investigar em ensaios clínicos randomizados os principais efeitos do consumo de probióticos no tratamento do diabetes gestacional e discutir supostas vias envolvidas, tendo como foco a modulação da microbiota intestinal. Alguns dos importantes resultados encontrados na literatura científica foram a melhora do metabolismo da glicose, perfil lipídico e inflamação, como redução de TNF- α e PCR, além do aumento da capacidade antioxidante e melhora da pressão arterial em mulheres com DMG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACETI, A. The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, [S.L.], v. 55, n. 11, p. 3114-3127, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2689-8>.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-21, 2005. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>.
- AHMADI, S., *et al.* The effects of synbiotic supplementation on markers of insulin metabolism and lipid profiles in gestational diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 116, n. 8, p. 1394-1401, 2016. <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114516003457>.
- AL-BADRI, M. R.; ZANTOUT, M. S.; AZAR, S. T. The role of adipokines in gestational diabetes mellitus. **Therapeutic Advances In Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 103-108, 2015. <http://dx.doi.org/10.1177/2042018815577039>.
- ARONSON, J. K. Defining ‘nutraceuticals’: neither nutritious nor pharmaceutical. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 8-19, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/bcp.12935>.
- ARUMUGAM, M., *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, [S.L.], v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09944>.
- ASHCROFT, F. M., *et al.* Is Type 2 Diabetes a Glycogen Storage Disease of Pancreatic β Cells? **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 17-23, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.014>.
- BATISTA, Â. G., *et al.* Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 6, p. 450-461, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.011>.
- BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Jaboticaba (Myrtaceae cauliflora) fruit and its by-products: alternative sources for new foods and functional components. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 112, p. 118-136, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.044>.
- BIANCO, M. E.; JOSEFSON, J. L. Hyperglycemia During Pregnancy and Long-Term Offspring Outcomes. **Current Diabetes Reports**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1-14, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-019-1267-6>.
- BOWERS, K., *et al.* Elevated Anthropometric and Metabolic Indicators among Young Adult Offspring of Mothers with Pregestational Diabetes: early results from the transgenerational effect on adult morbidity study (the team study). **Journal Of Diabetes Research**, [S.L.], v. 2021, p. 1-10, 2021. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6590431>.

CAVALCANTE, R. G. S., *et al.* The probiotic *Lactobacillus 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>.

CHEN, Q., *et al.* A Vegetable Dietary Pattern Is Associated with Lowered Risk of Gestational Diabetes Mellitus in Chinese Women. **Diabetes & Metabolism Journal**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 887-896, 2020. <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2019.0138>.

CHOUDHURY, A. A.; RAJESWARI, V. D. Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 143, p. 112183, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183>.

CHU, A. H. Y.; GODFREY, K. M. Gestational Diabetes Mellitus and Developmental Programming. **Annals Of Nutrition And Metabolism**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 4-15, 2020. <http://dx.doi.org/10.1159/000509902>.

COLLETTI, A.; CICERO, A. F. G. Nutraceutical Approach to Chronic Osteoarthritis: from molecular research to clinical evidence. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 23, p. 12920, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312920>.

CORTEZ, R. V., *et al.* Microbiome and its relation to gestational diabetes. **Endocrine**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 254-264, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-018-1813-z>.

CRUSELL, M. K. W., *et al.* Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum. **Microbiome**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-19, 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-018-0472-x>.

CRUZ NETO, J. P. R., *et al.* Safety Evaluation of a Novel Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* in Rats. **Probiotics & Antimicro. Prot**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 752-762, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10077-3>.

CUEVA, C., *et al.* An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 99, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22010099>.

DALEY, D. K.; MYRIE, S. B. Diabetes and vitamin D: the effect of insulin sensitivity and gut microbial health. **Advances In Food And Nutrition Research**, [S.L.], p. 160-184, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2024.04.001>.

DAS, L., *et al.* Role of nutraceuticals in human health. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 173-183, 26 fev. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4>.

DE 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, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>.

DE ALBUQUERQUE LEMOS, D. E., DE BRITO ALVES, J. L.; SOUZA, E. L. Probiotic therapy as a promising strategy for gestational diabetes mellitus management. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [S.L.], p. 1-13, 2024. <http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2024.2409880>.

DE BRITO ALVES, J. L., *et al.* New Insights on the Use of Dietary Polyphenols or Probiotics for the Management of Arterial Hypertension. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00448>.

DE LUNA FREIRE, M. O., *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.], v. 15, n. 3, p. 601-613, 2021a. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-021-09878-1>.

DE LUNA FREIRE, M. O., *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, 2021b. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10092202>.

DOHaD BRASIL. Conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e das Doenças. **Sobre**. 2024. Disponível em: <https://www.dohadbrasil.com.br/about-1>. Acesso em: 07 out. 2024.

SANTOS, A. S., *et al.* Effects of Quercetin and Resveratrol on in vitro Properties Related to the Functionality of Potentially Probiotic Lactobacillus Strains. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-13, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02229>.

DRAGANO, N. R. V., *et al.* Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 110, n. 3, p. 447-455, 2013. <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114512005090>.

DUAN, Y., *et al.* Prepregnancy maternal diabetes combined with obesity impairs placental mitochondrial function involving Nrf2/ARE pathway and detrimentally alters metabolism of offspring. **Obesity Research & Clinical Practice**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 90-100, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2017.01.002>.

EGAN, A. M.; DOW, M. L.; VELLA, A. A Review of the Pathophysiology and Management of Diabetes in Pregnancy. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 95, n. 12, p. 2734-2746, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.02.019>.

EGSHATYAN, L., *et al.* Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. **Endocrine Connections**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1530/ec-15-0094>.

EUROPIAN NUTRACEUTICAL ASSOCIATION. **Nutraceuticals Products**: what does nutraceutical means?. What Does Nutraceutical means?. 2016. Disponível em: <https://asclepius.com.eg/nutraceuticals-products/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

FARAHVAR, S.; WALFISCH, A.; SHEINER, E.. Gestational diabetes risk factors and long-term consequences for both mother and offspring: a literature review. **Expert Review Of Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 63-74, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/17446651.2018.1476135>.

FARHADI, K., *et al.* Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 199, p. 847-855, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083>.

FERREIRA, G., *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.], v. 14, n. 2, p. 349-359, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>.

FERROCINO, I., *et al.* Changes in the gut microbiota composition during pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 12216, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30735-9>.

FILARDI, T., *et al.* Bisphenol A and Phthalates in Diet: an emerging link with pregnancy complications. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 525-540, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12020525>.

FRANCIS, E. C., *et al.* Novel Metabolic Subtypes in Pregnant Women and Risk of Early Childhood Obesity in Offspring. **Jama Network Open**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 237030, 2023. <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.7030>.

FREINKEL, N. Banting Lecture 1980: of pregnancy and progeny. **Diabetes**, [S.L.], v. 29, n. 12, p. 1023-1035, 1980. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diab.29.12.1023>.

FUJIWARA, N., *et al.* Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women. **Journal Of Investigative And Clinical Dentistry**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/jicd.12189>.

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. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>.

GARRISON, M. A. Screening, Diagnosis, and Management of Gestational Diabetes Mellitus. **Am Fam Physician**, [S.L.], v. 7, n. 91, p. 460-467, 2015.

GASCHO, C. L. L., *et al.* Predictors of cesarean delivery in pregnant women with gestational diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / Rbgo Gynecology And Obstetrics**, [S.L.], v. 39, n. 02, p. 060-065, 2017. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0037-1598644>.

GEORGAKOULI, K., *et al.* The Effects of an Olive Fruit Polyphenol-Enriched Yogurt on Body Composition, Blood Redox Status, Physiological and Metabolic Parameters

and Yogurt Microflora. **Nutrients**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 344, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8060344>.

GOHIR, W., *et al.* Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptional diet. **Gut Microbes**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 310-320, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1086056>.

GOLIC, M., *et al.* Diabetes Mellitus in Pregnancy Leads to Growth Restriction and Epigenetic Modification of the Srebf2 Gene in Rat Fetuses. **Hypertension**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 911-920, 2018. <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.10782>.

GORCZYCA, K., *et al.* Changes in the Gut Microbiome and Pathologies in Pregnancy. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 19, n. 16, p. 9961, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19169961>.

GUO, Z., *et al.* Metabolites of Gut Microbiota and Possible Implication in Development of Diabetes Mellitus. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 70, n. 20, p. 5945-5960, 2022. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07851>.

HAJIFARAJI, M., *et al.* Effect of probiotic supplements in women with gestational diabetes mellitus on inflammation and oxidative stress biomarkers: a randomized clinical trial. **Asia Pacific Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 1-13, 2018. <http://dx.doi.org/10.6133/apjcn.082017.03>.

HASAIN, Z., *et al.* Gut Microbiota and Gestational Diabetes Mellitus: a review of host-gut microbiota interactions and their therapeutic potential. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-19, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00188>.

HILL, C., *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HOMAYOUNI, A., *et al.* Prevention of Gestational Diabetes Mellitus (GDM) and Probiotics: mechanism of action. **Current Diabetes Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 538-545, 2020. <http://dx.doi.org/10.2174/1573399815666190712193828>.

HUANG, L., *et al.* Impacts of gut microbiota on gestational diabetes mellitus: a comprehensive review. **European Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 60, n. 5, p. 2343-2360, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-021-02483-6>.

IONESCU, R. F., *et al.* Gut Microbiome Changes in Gestational Diabetes. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 21, p. 1-16, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232112839>.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th ed.; IDF: Brussels, Belgium, 2017.

ISOLA, G. The Impact of Diet, Nutrition and Nutraceuticals on Oral and Periodontal Health. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 2724, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12092724>.

JAMILIAN, M., *et al.* The effects of vitamin D and probiotic co-supplementation on glucose homeostasis, inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 2098-2105, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2018.10.028>.

JOHNS, E. C., *et al.* Gestational Diabetes Mellitus: mechanisms, treatment, and complications. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 743-754, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.004>.

KAMIŃSKA, K., *et al.* Probiotics in the Prevention and Treatment of Gestational Diabetes Mellitus (GDM): a review. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 20, p. 4303, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/nu14204303>.

KARAMALI, M., *et al.* Effects of probiotic supplementation on glycaemic control and lipid profiles in gestational diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Diabetes & Metabolism**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 234-241, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2016.04.009>.

KARAMALI, M., *et al.* The Effects of Synbiotic Supplementation on Pregnancy Outcomes in Gestational Diabetes. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 496-503, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-017-9313-7>.

KARKIA, R., *et al.* Gestational Diabetes Mellitus: association with maternal and neonatal complications. **Medicina**, [S.L.], v. 59, n. 12, p. 2096, 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/medicina59122096>.

KHALAFALLAH, A., *et al.* Glycosylated haemoglobin for screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. **Bmj Open**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011059>.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. **Nutrition Research Reviews**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 35-51, 2017. <http://dx.doi.org/10.1017/s095442241700018x>.

KIJMANAWAT, A., *et al.* Effects of probiotic supplements on insulin resistance in gestational diabetes mellitus: a double blind randomized controlled trial. **Journal Of Diabetes Investigation**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 163-170, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jdi.12863>.

KOHLHEPP, L. M., *et al.* Physiologische Veränderungen in der Schwangerschaft. **Der Anaesthetist**, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 383-396, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00101-018-0437-2>.

KOREN, O., *et al.* Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy. **Cell**, [S.L.], v. 150, n. 3, p. 470-480, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008>.

KUANG, Y. S., *et al.* Connections between the human gut microbiome and gestational diabetes mellitus. **Gigascience**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 1-12, 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/gigascience/gix058>.

LAMBERS, D., *et al.* Endocrine Disruptors: a potential risk factor for gestational diabetes mellitus. **American Journal Of Perinatology**, [S.L.], v. 33, n. 13, p. 1313-1318, 2016. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1586500>.

LAPPAS, M., *et al.* The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 3061-3100, 2011. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3765>.

LEITE, A. V., *et al.* Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 2277-2283, 2011. <http://dx.doi.org/10.1021/jf103181x>.

LEITE-LEGATTI, A. V., *et al.* Jaboticaba peel: antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.044>.

LENQUISTE, S. A., *et al.* Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 153-160, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.052>.

LIU, H., *et al.* Alterations of Gut Microbiota and Blood Lipidome in Gestational Diabetes Mellitus With Hyperlipidemia. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-10, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01015>.

LIU, Y., *et al.* Perturbations of gut microbiota in gestational diabetes mellitus patients induce hyperglycemia in germ-free mice. **Journal Of Developmental Origins Of Health And Disease**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 580-588, 2020. <http://dx.doi.org/10.1017/s2040174420000768>.

LIZÁRRAGA, D.; GARCÍA-GASCA, A. The Placenta as a Target of Epigenetic Alterations in Women with Gestational Diabetes Mellitus and Potential Implications for the Offspring. **Epigenomes**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 13, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/epigenomes5020013>.

LÓPEZ-TINOCO, C., *et al.* Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 201-208, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-011-0264-2>.

LOWE, W. L., *et al.* Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): maternal gestational diabetes mellitus and childhood glucose

metabolism. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 372-380, 2019.
<http://dx.doi.org/10.2337/dc18-1646>.

LUO, C., *et al.* Synbiotic supplementation for glycemic status in pregnant women: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Gynecological Endocrinology**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 146-151, 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/09513590.2020.1853696>.

LU, X., *et al.* Maternal gut microbiota in the health of mothers and offspring: from the perspective of immunology. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 15, p. 1-20, 2024.
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1362784>.

MAGNI, P.; BARAGETTI, A.; POLI, A. Special Issue: nutraceutical approaches to cardiovascular and metabolic diseases. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 24, p. 5399, 2022.
<http://dx.doi.org/10.3390/nu14245399>.

MARSIGLIA, W. I. M. L., *et al.* Modelagem e simulação do processo de secagem das cascas de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-14, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13214>.

MARTIN, Z., *et al.* What is the efficacy of dietary, nutraceutical, and probiotic interventions for the management of gastroesophageal reflux disease symptoms? A systematic literature review and meta-analysis. **Clinical Nutrition Espen**, [S.L.], v. 52, p. 340-352, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.09.015>.

MASSA, N. M. L., *et al.* Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **Lwt**, [S.L.], v. 131, p. 109766, 2020.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109766>.

MASSA, N. M. L., *et al.* In vitro colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 388, p. 133003, 2022.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>.

MCINTYRE, H. D., *et al.* Gestational diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-19, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>.

MEIJNIKMAN, A. S., *et al.* Evaluating Causality of Gut Microbiota in Obesity and Diabetes in Humans. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 133-153, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1210/er.2017-00192>.

MENDONÇA, E. L. S. S., *et al.* Gestational Diabetes Mellitus: the crosslink among inflammation, nitroxidative stress, intestinal microbiota and alternative therapies. **Antioxidants**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 129-168, 2022.
<http://dx.doi.org/10.3390/antiox11010129>.

MIAO, M., *et al.* The Protective Effects of Inulin-Type Fructans Against High-Fat/Sucrose Diet-Induced Gestational Diabetes Mice in Association With Gut Microbiota Regulation. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1-15, 2022.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.832151>.

MIERZYŃSKI, R., *et al.* Nesfatin-1 and Vaspin as Potential Novel Biomarkers for the Prediction and Early Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 159, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010159>.

MIRSKY, E., *et al.* Comparison of the Prevalence of Gestational Diabetes Pre-COVID-19 Pandemic Versus During COVID-19 [A196]. **Obstetrics & Gynecology**, [S.L.], v. 139, n. 1, p. 57-70, 2022. <http://dx.doi.org/10.1097/01.aog.0000826060.00417.e4>.

MITANCHEZ, D. Foetal and neonatal complications in gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal complications. **Diabetes & Metabolism**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 617-627, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2010.11.013>.

MITANCHEZ, D., *et al.* The offspring of the diabetic mother – Short- and long-term implications. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 256-269, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.08.004>.

MOCELLIN, L. P., *et al.* Gestational diabetes mellitus prevalence in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Reports in Public Health**, [S.L.], v. 40, p. 1-20, 2024. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311XEN064919>

MURTHY, K. S., *et al.* Evaluation of oxidative stress and proinflammatory cytokines in gestational diabetes mellitus and their correlation with pregnancy outcome. **Indian Journal Of Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 79, 2018. http://dx.doi.org/10.4103/ijem.ijem_232_16.

NASCIMENTO, H. M. A., *et al.* Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], p. 1-16, 2024. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>.

NEGRATO, C. A., *et al.* Glycemic and nonglycemic mechanisms of congenital malformations in hyperglycemic pregnancies: a narrative review. **Archives Of Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], p. 908-918, 2022. <http://dx.doi.org/10.20945/2359-3997000000521>.

NEHMI-FILHO, V. Novel nutraceutical supplements with yeast β -glucan, prebiotics, minerals, and *Silybum marianum* (silymarin) ameliorate obesity-related metabolic and clinical parameters: a double-blind randomized trial. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 13, p. 1-11, 2023. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.1089938>.

NGUYEN, L.; CHAN, S.Y.; TEO, A. K. K. Metformin from mother to unborn child – Are there unwarranted effects? **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 35, p. 394-404, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.047>.

NURIEL-OHAYON, M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-13, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01031>.

OLIVEIRA, Y., *et al.* Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food & Function**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 5581-5594, 2020. <http://dx.doi.org/10.1039/d0fo00514b>.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil. Vol. 1, Sociedade Brasileira de Diabetes. Brasília; 2017. 1–36 p. Available from: <https://www.diabetes.org.br>.

ORAL, S., *et al.* Prediction of gestational diabetes mellitus and perinatal outcomes by plasma zonulin levels. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, [S.L.], v. 309, n. 1, p. 119-126, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-022-06751-6>.

OTTOSSON, F., *et al.* Connection Between BMI-Related Plasma Metabolite Profile and Gut Microbiota. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 1491-1501, 2018. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2017-02114>.

PANTHAM, P.; AYE, I.L.M.H.; POWELL, T.L. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. **Placenta**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 709-715, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.006>.

PARSONS, J.; BRELJE, T. C.; SORENSON, R. L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology**, [S.L.], v. 130, n. 3, p. 1459-1466, 1992. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.130.3.1537300>.

PAUL, H. A., *et al.* Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20683>.

PÉREZ-PÉREZ, A., *et al.* Leptin and Nutrition in Gestational Diabetes. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1-18, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12071970>.

PINTO, Y., *et al.* Gestational diabetes is driven by microbiota-induced inflammation months before diagnosis. **Gut**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 918-928, 2023. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328406>.

PLOWS, J., *et al.* The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 3342-3363, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19113342>.

PONZO, V., *et al.* Diet-Gut Microbiota Interactions and Gestational Diabetes Mellitus (GDM). **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 330, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11020330>.

QIN, Y., *et al.* Hyperglycemia results in significant pathophysiological changes of placental spiral artery remodeling and angiogenesis, further contributing to congenital

defects. **Frontiers In Bioscience-Landmark**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 965, 2021. <http://dx.doi.org/10.52586/5001>.

QUATRIN, A., *et al.* The Hepatoprotective Effect of Jaboticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis. **Journal Of Nutrition And Metabolism**, [S.L.], v. 2018, p. 1-13, 2018. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9794629>.

RAMIRO-CORTIJO, D., *et al.* Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications. **Placenta**, [S.L.], v. 47, p. 37-45, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.090>.

REYES-MUÑOZ, E., *et al.* Uso de mioinositol más Bifidobacterium lactis y Lactobacillus rhamnosus para la prevención de diabetes mellitus gestacional en mujeres mexicanas. **Gaceta Médica de México**, [S.L.], v. 156, n. 93, p. 1-10, 2023. <http://dx.doi.org/10.24875/gmm.m20000438>.

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. 14-42, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7010014>.

RIVIÈRE, A., *et al.* Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 979, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>.

ROLD, L. S., *et al.* Characteristics of the gut microbiome in women with gestational diabetes mellitus: a systematic review. **Plos One**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-28, 2022. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0262618>.

RUDGE, M. V.C., *et al.* Consequences of the exposome to gestational diabetes mellitus. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1867, n. 2, p. 130282, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130282>.

RUIZ-GRACIA, T., *et al.* Lifestyle patterns in early pregnancy linked to gestational diabetes mellitus diagnoses when using IADPSG criteria. The St Carlos gestational study. **Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 699-705, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.04.017>.

RUIZ-OTERO, N.; TESSEM, J. S.; BANERJEE, R. R.. Pancreatic islet adaptation in pregnancy and postpartum. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 834-847, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2024.04.007>.

SAMPAIO, K. B., *et al.* 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**, [S.L.], v. 161, p. 111800, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>.

SANTOS, L. A. C., *et al.* A Mix of Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum*

Strains Alters the Gut Microbiota in a Dose- and Sex-Dependent Manner in Wistar Rats. **Microorganisms**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 659, 2024. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12040659>.

SWANSON, K. S., *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>.

SCIFRES, C. M., *et al.* Large-for-Gestational-Age Ultrasound Diagnosis and Risk for Cesarean Delivery in Women With Gestational Diabetes Mellitus. **Obstetrics & Gynecology**, [S.L.], v. 126, n. 5, p. 978-986, 2015. <http://dx.doi.org/10.1097/aog.0000000000001097>.

SENESI, P., *et al.* Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases: nutraceutical interventions related to caloric restriction. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 15, p. 7772, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157772>.

SHANG, M.; DONG, X.; HOU, L. Correlation of adipokines and markers of oxidative stress in women with gestational diabetes mellitus and their newborns. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 637-646, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jog.13586>.

SHARMA, A. K., *et al.* Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 17, p. 2672, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11172672>.

SHRIVASTAVA, V., *et al.* Beta cell adaptation to pregnancy requires prolactin action on both beta and non-beta cells. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89745-9>.

SILVA, J. Y. P., *et al.* Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jabuticaba Peel and *Limosilactobacillus fermentum* Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.L.], p. 1-17, 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>.

SINHA, N.; WALKER, G. L.; SEN, A. Looking at the Future Through the Mother's Womb: gestational diabetes and offspring fertility. **Endocrinology**, [S.L.], v. 162, n. 12, p. 1-11, 2021. <http://dx.doi.org/10.1210/endo/bqab209>.

SIRCANA, A., *et al.* Altered Gut Microbiota in Type 2 Diabetes: just a coincidence?. **Current Diabetes Reports**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 98, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-018-1057-6>.

SOTIRIADIS, A.; CHATZAKIS, C.; CAVORETTO, P. Gestational Diabetes Mellitus Pharmacological Prevention and Treatment. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 27, n. 36, p. 3833-3840, 2021. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612827666210125155428>.

SOUZA, E. L., *et al.* Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 1645-1659, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>.

STERN, C., *et al.* Placental Endocrine Activity: adaptation and disruption of maternal glucose metabolism in pregnancy and the influence of fetal sex. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 23, p. 12722, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312722>.

TOCANTINS, C., *et al.* The birth of cardiac disease: mechanisms linking gestational diabetes mellitus and early onset of cardiovascular disease in offspring. **Wires Mechanisms Of Disease**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 1-20, 2022. <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1555>.

USMAN, T. O., *et al.* Beta-cell compensation and gestational diabetes. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 299, n. 12, p. 105405, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105405>.

VALERO, P., *et al.* Exposome and foetoplacental vascular dysfunction in gestational diabetes mellitus. **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 87, p. 101019, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2021.101019>.

TERTTI, K., *et al.* The degree of fetal metformin exposure does not influence fetal outcome in gestational diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 731-738, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-014-0570-6>.

ULLMO, S., *et al.* Pathologic ventricular hypertrophy in the offspring of diabetic mothers: a retrospective study. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 1319-1325, 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehl416>.

WAN, J., *et al.* Effects of galactooligosaccharides on maternal gut microbiota, glucose metabolism, lipid metabolism and inflammation in pregnancy: a randomized controlled pilot study. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 14, p. 1-10, 2023. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2023.1034266>.

WAN, J.; MA, J. Efficacy of dietary supplements targeting gut microbiota in the prevention and treatment of gestational diabetes mellitus. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1-14, 2022. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.927883>.

WANG, Q., *et al.* Metabolic profiling of pregnancy: cross-sectional and longitudinal evidence. **Bmc Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-016-0733-0>.

WANG, F.; REECE, E. A.; YANG, P. Advances in revealing the molecular targets downstream of oxidative stress-induced proapoptotic kinase signaling in diabetic embryopathy. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [S.L.], v. 213, n. 2, p. 125-134, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.01.016>.

WANG, X., *et al.* Altered gut bacterial and metabolic signatures and their interaction in gestational diabetes mellitus. **Gut Microbes**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1840765, 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2020.1840765>.

WEI, B., *et al.* Gut microbiota-mediated xanthine metabolism is associated with resistance to high-fat diet-induced obesity. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.L.], v. 88, p. 108533, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108533>.

WICKENS, K. L., *et al.* Early pregnancy probiotic supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* HN001 may reduce the prevalence of gestational diabetes mellitus: a randomised controlled trial. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 117, n. 6, p. 804-813, 2017. <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114517000289>.

WHO. Diagnostic criteria and classification of hyperglycemia first detected in pregnancy: A World Health Organization Guideline. **Diabetes Res Clin Pract** [Internet], v.103, n. 3, p. 341-363, 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk169024/>

ZAJDENVERG, L., *et al.* Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, [S.L.], p. 1-7, 2022a. <http://dx.doi.org/10.29327/557753.2022-11>.

XU, W., *et al.* Anti-inflammatory activities of puerarin in high-fat diet-fed rats with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 47, n. 10, p. 7537-7546, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-020-05816-6>.

XUE, C., *et al.* Vertical transmission of the gut microbiota influences glucose metabolism in offspring of mice with hyperglycaemia in pregnancy. **Microbiome**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-19, 2022. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-022-01318-8>.

YANG, P., *et al.* Decoding the oxidative stress hypothesis in diabetic embryopathy through proapoptotic kinase signaling. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [S.L.], v. 212, n. 5, p. 569-579, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.11.036>.

YE, D., *et al.* Integrative metagenomic and metabolomic analyses reveal gut microbiota-derived multiple hits connected to development of gestational diabetes mellitus in humans. **Gut Microbes**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 12458, 2022b. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2022.2154552>.

YE, G., *et al.* The Gut Microbiota in Women Suffering from Gestational Diabetes Mellitus with the Failure of Glycemic Control by Lifestyle Modification. **Journal Of Diabetes Research**, [S.L.], v. 2019, p. 1-12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6081248>.

YE, W., *et al.* Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. **Bmj**, [S.L.], p. 067946, 2022a. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj-2021-067946>.

ZAJDENVERG, L., *et al.* Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, [S.L.], p. 1-15, 2022a. <http://dx.doi.org/10.29327/557753.2022-11>.

ZAJDENVERG, L., *et al.* Tratamento farmacológico do diabetes na gestação. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, [S.L.], p. 1-23, 2022b. <http://dx.doi.org/10.29327/557753.2022-13>.

ZHANG, C., *et al.* Aberrant expression of oxidative stress related proteins affects the pregnancy outcome of gestational diabetes mellitus patients. **Am J Transl Res.**, [S. L.], v. 1, n. 11, p. 269-279, 2019.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion In Food Science**, [S.L.], v. 8, p. 33-42, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.

ZHOU, L., *et al.* Probiotics and synbiotics show clinical efficacy in treating gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. **Primary Care Diabetes**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 937-947, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcd.2021.08.005>.

ZHU, Y.; ZHANG, C. Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: a global perspective. **Current Diabetes Reports**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-015-0699-x>.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À FOOD CHEMISTRY

Synbiotic nutraceutical with freeze-dried jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* strains improves glycemic control, gut microbiota, and inflammation in rats with gestational diabetes and protects offspring from cardiac autonomic dysfunction later in life

Deborah Emanuelle de Albuquerque Lemos¹, Evandro de Leite Souza¹, Micaelle Oliveira de Luna Freire¹, Jaelison Yandro Pereira da Silva¹, Paulo César Trindade da Costa¹, Josiane de Campos Cruz², Alisson Macário de Oliveira³, João Felipe Mota⁴, José Luiz de Brito Alves¹.

¹ Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

³ Center for Biological and Health Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil

⁴ School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

***Corresponding author:**

José Luiz de Brito Alves, PhD

Federal University of Paraíba, Health Science Center, Department of Nutrition
Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil

CEP : 58051-900

Phone/fax : ++ 55 81 9 98455485

jose.luiz@academico.ufpb.br

Abstract

Gestational diabetes mellitus (GDM) is linked with gut microbiota alteration and poses short- and long-term health risks for both mother and offspring, largely driven by increased inflammation and oxidative stress. Therefore, the development of a synbiotic enriched with anti-inflammatory bioactive compounds may exert synergistic effects on gut microbiota and metabolic dysfunction, serving as a valuable adjunct in the treatment of GDM. This study investigates the effects of nutraceutical treatment combining jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) and *Limosilactobacillus fermentum* strains on gut microbiota composition, glycemic and lipid profiles, and inflammatory biomarkers in rats with GDM, as well as its impact on the cardiometabolic health of their offspring. Pregnant Wistar rats were divided into three groups: healthy controls (CTL, n=12), GDM receiving placebo (GDM, n=12), and GDM receiving the nutraceutical (GDM+Nut, n=12). GDM was induced by a high-fat diet (HFD) and streptozotocin (25mg/kg, i.p.). The nutraceutical, containing *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jaboticaba peel (2 g/kg), or placebo (phosphate buffered solution), was administered via intragastric gavage twice daily until the end of gestation. After weaning, male (n=8) and female (n=8) offspring were fed a standard laboratory chow diet until they reached 80 days of age. Nutraceutical administration improved glucose tolerance and reduced serum inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) compared to the GDM group. The proportion of Firmicutes/Bacteroidetes and beta diversity were increased without altering alpha diversity index in the GDM+Nut compared to the GDM group. Additionally, the nutraceutical enhanced the abundance of short-chain fatty acids-producing bacteria. Although maternal nutraceutical administration did not improve glucose tolerance in offspring, it positively influenced cardiovascular health parameters, reducing blood pressure and autonomic dysfunction. Synbiotic nutraceutical supplementation with freeze-dried jaboticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* shows potential as an alternative therapy for GDM, benefiting maternal glycemic control and gut microbiota while mitigating autonomic dysfunction in offspring.

Keywords: Gut microbiota, Gestational diabetes, Glucose Intolerance, Inflammation, Nutraceuticals, Autonomic function, Cardiovascular System.

1. Introduction

Glycemic disorders are common during pregnancy, with approximately 16% of live births occurring to women who have had episodes of hyperglycemia during pregnancy [1]. The International Diabetes Federation estimates that 14% of pregnancies are affected by gestational diabetes mellitus (GDM), representing around 18 million cases annually [2]. The pandemic COVID-19 caused a 38% increase in the prevalence of GDM, mainly due to stressful situations and lifestyle changes [3]. Offspring exposed to a hyperglycemic intrauterine environment are at an increased risk of developing cardiovascular and metabolic diseases in adulthood, including obesity, arterial hypertension, and type 2 diabetes mellitus [1].

Alterations in the gut microbiota (GM) during pregnancy contribute to the development of systemic disorders such as gestational glucose intolerance, insulin resistance, hormonal dysregulation, and increased levels of inflammation and oxidative stress. These disruptions can have both immediate and long-term harmful effects on maternal and fetal health [2-4].

Studies have shown that probiotic administration can effectively reduce gut dysbiosis, plasma glucose, insulin levels, improve lipid parameters, and reduce inflammation and oxidative stress in pregnant women with GDM. These benefits also extend to fetal outcomes, such as a reduced incidence of fetal macrosomia and hyperbilirubinemia [5, 6]. Similarly, prebiotics consumption has been shown to modulate GM, reduce glucose absorption, and improve insulin sensitivity in GDM [7, 8]. These findings suggest that the combined intake of pro- and prebiotics may be a beneficial therapeutic strategy for managing GDM [9-11].

Developing nutraceuticals combining probiotics and prebiotics has been increasingly explored [12-14]. The nutraceutical evaluated in this study comprises a

combination of the probiotic strains *Limosilactobacillus fermentum* 139, *L. fermentum* 263, and *L. fermentum* 296 and jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) peel [14]. Preliminary, *in vitro* tests have demonstrated its potential in modulating the human GM and increasing the production of short-chain fatty acids (SCFAs) and bioactive metabolites during colonic fermentation [14]. However, its effects on glycemic control and inflammation remain unexplored.

It has been reported that *L. fermentum* strains can modulate GM and reduce dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in rats fed a high-fat diet [15, 16]. Furthermore, jaboticaba peel is rich in fiber, vitamins, minerals, and phenolic compounds (e.g., anthocyanins, polyphenols, tannins and flavonoids) that confer a range of health benefits [17]. Studies have shown that jaboticaba peel supplementation may be effective in improving lipid profile, glucose metabolism, oxidative stress, and inflammatory markers [18-20].

The use of hypoglycemic agents, such as metformin and glyburide, during pregnancy is limited due to their ability to cross the placenta [21], and the long-term effects of intrauterine exposure to these agents on offspring are poorly understood [22]. Therefore, alternative strategies for managing GDM are essential to mitigate the risks of diseases and complications in the mother-baby binomial. This study aimed to investigate the effects of a synbiotic nutraceutical formulation containing freeze-dried Jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) and *L. fermentum* strains on the treatment of GDM in rats, as well as its impact on the cardiometabolic health of offspring. Secondary outcomes, including GM composition, lipid and glycemic profiles, and inflammatory biomarkers, were also evaluated in dams.

2. Materials and methods

Animals and ethical aspects

Thirty-six female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 60 days, were housed in polypropylene cages with filtered water and food *ad libitum*, on a 12-h light-dark cycle, with temperature (22 ± 1 °C) and controlled humidity ($55 \pm 10\%$). All experimental procedures were approved by an Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (protocol number 2218270124) and followed the recommendations of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the International Principles for Biomedical Research Involving Animals. Efforts were made to reduce the number of animals and their suffering according to the good practice guidelines.

Preparation of the synbiotic nutraceutical

The synbiotic nutraceutical consisted of *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263, *L. fermentum* 296, jabuticaba peel and fructooligosaccharide (FOS) [14]. Samples of jabuticaba cultivar Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg, were collected, selected, sanitized with sodium hypochlorite (150 ppm, 15 min), and pulped. The peels were separated, frozen (-20 °C), and freeze-dried at -56 °C for 20 h with a freeze-drying speed of 1 mm/h (Liotop, São Paulo, SP, Brazil). After freeze-drying, the dehydrated peels were crushed, sieved, and stored in hermetically sealed metalized bags under refrigeration (4 ± 0.5 °C) [14].

L. fermentum 139, 263 and 296 strains were previously isolated from fruits, namely mango, pineapple, and strawberry, respectively [23]. Each strain was grown anaerobically (37 °C, for 20 to 24 h) in MRS broth (AnaeroGen, Oxoid Anaerogen Anaerobic System, Basingstoke, Hampshire, UK), centrifuged for 10 min ($1696 \times g$, 4 °C) and washed twice with sterile saline (NaCl, 0.85%, w/v). Each strain was resuspended in sterile distilled

water and mixed in equal proportions (1:1:1, v/v) to obtain a cell suspension with an optical density at 625 nm of 2.5 and a viable cell count of approximately $11 \log \text{CFU/mL}$.

Distilled water was added to the mixed suspension of freeze-dried *L. fermentum* strains together with lyophilized Jabuticaba peel (17g) and FOS (20% w/v, recognized cryoprotectant for bacterial cells) to produce the nutraceutical. The mixture was frozen at -80°C for 24 h and lyophilized for 30 h in a benchtop lyophilizer (Liotop, model L-101; temperature $-56 \pm 2^\circ\text{C}$, vacuum pressure $< 170 \mu\text{Hg}$, lyophilization rate 1 mm/h) and stored under refrigeration ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$) with light protection. After freeze-drying, the viable cell counts were reduced, but remained high ($11.15 \pm 0.15 \log \text{CFU/g}$) [14].

Experimental design

Mothers

Female rats were randomly assigned to three groups: (i) the control group (CTL, $n=12$), which received a control diet prepared according to the American Institute of Nutrition - AIN-93 G; (ii) gestational diabetes + vehicle group (GDM, $n=12$); and (iii) gestational diabetes + nutraceutical group (GDM+Nut, $n=12$), receiving the tested nutraceutical. The GDM and GDM+Nut groups received a high-fat diet (HFD) purchased from Rhoister (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brazil) and a 20% sucrose solution. Compositions of the CTL diet and HFD are shown in **Table 1**. The tested synbiotic nutraceutical containing *L. fermentum* strains and jabuticaba peel (2g/kg) or vehicle (phosphate buffered solution, PBS) was administered by intragastric gavage twice daily until the end of gestation. Body weight and food consumption were measured twice weekly throughout the treatment period. Other experimental protocols included glucose tolerance tests, fecal content collection, hematological and biochemical assays, and measurement of inflammatory cytokines (**Figure 1**).

Table 1. Composition of control and high-fat diet (HFD) offered.

Ingredients (g/100g)	Diets	
	Control (AIN-93M)*	HFD**
Corn starch	39.75	33.09
Dextrinized corn starch	13.20	15.50
Casein [#]	20.00	19.86
Sucrose	10.00	6.00
Soybean oil	7.00	3.00
Animal fat (lard)	0.00	6.00
Non-hydrolyzed vegetable fat	0.00	5.00
Sigma cholesterol	0.00	1.00
Sigma colic acid	0.00	0.50
Cellulose	5.00	5.00
Mineral mix 93M	3.50	3.50
Vitamin mix	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25
t-BHQ ***	0.014	0.014
Nutritional composition		
Calories (Kj/100 g)	16.46	18.05
Carbohydrate (%)	63.8	50.5
Protein (%)	20.3	18.3
Lipids (%)	15.9	31.2

* Adapted from Reeves et al. (1993). ** Rhoster—Industry and Trade Ltd. *** t-BHQ: tert-Butylhydroquinone. # Casein showed 85% purity (85 g protein for each 100 g casein).

Offspring

Litters were reduced to four males and four females per dam, which were named OCTL, OGDM and OGDM+Nut groups. After weaning, offspring were fed a standard laboratory diet. Weight and length were determined from birth to the end of the experiment using an electronic laboratory balance (PFB 6000-0M - KERN & SOHN) and a tape measure (MedCenter®). Oral glucose tolerance test was performed at 60 days of age and the insulin tolerance test after 72 h. At 70-80 days of age, vascular catheters were implanted for blood pressure and heart rate and autonomic function assessment. After recording, rats were euthanized with an overdose of intraperitoneal pentobarbital sodium (180 mg/kg) (**Figure 1**).

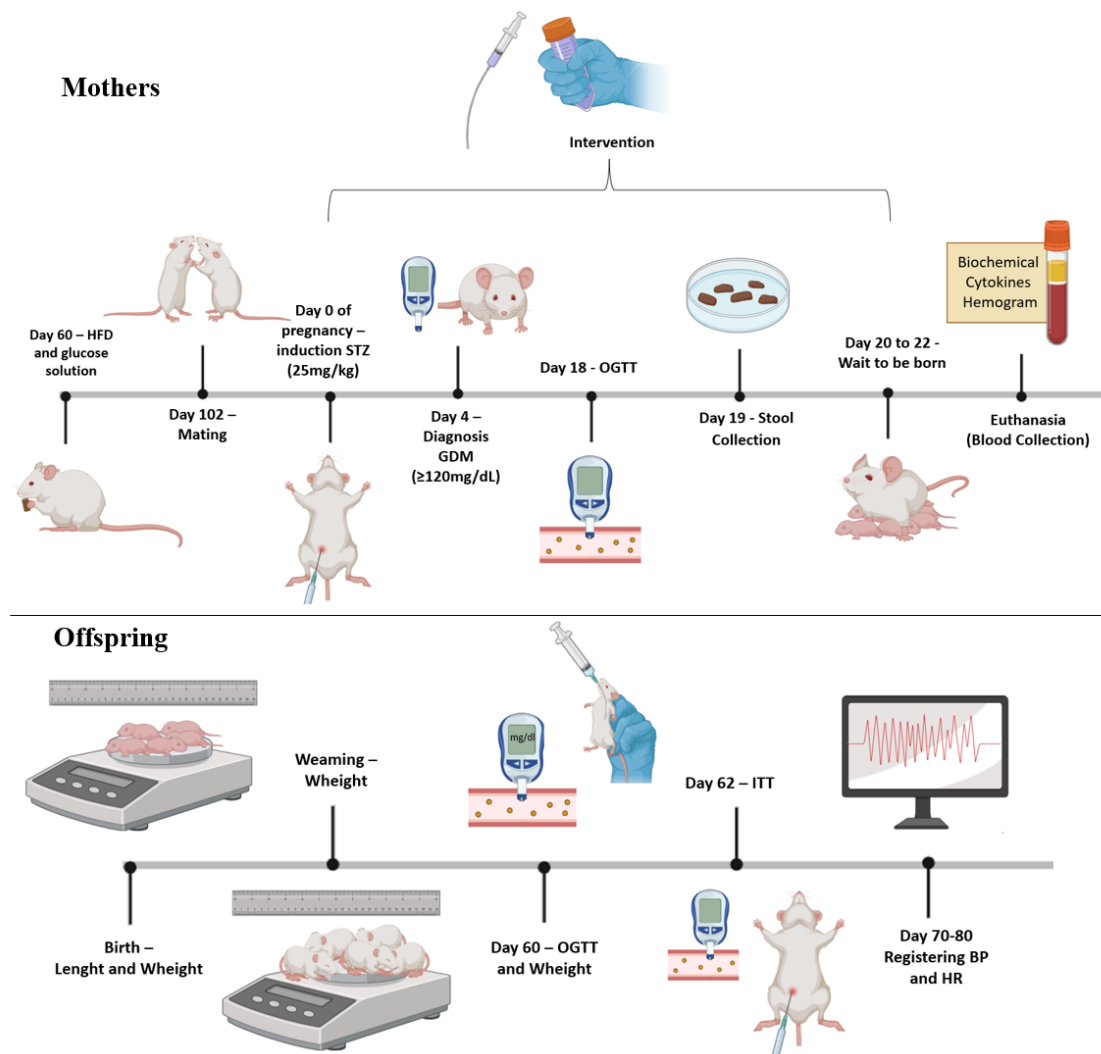


Figure 1. Experimental design of mothers and offspring. HFD: High fat diet; STZ: streptozotocin; OGTT: oral glucose tolerance test; ITT: insulin tolerance test; BP: blood pressure; HR: heart rate.

Induction of GDM

After 6 weeks of HFD and 20% sucrose solution in drinking water, females were mated in a 1:1 male-to-female ratio. Daily vaginal smears were performed to confirm pregnancy by the appearance of sperm or a mucus plug observed by microscopy. When successful mating was established, day 0 of gestation was considered, and pregnant rats were fasted for 10 h. After this period, female rats received an intraperitoneal injection of

streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich) at a single dose of 25 mg/kg to induce a model of gestational diabetes mellitus. Blood glucose was monitored before and after STZ administration (72 h later) using a blood glucose meter (Accu Chek Active, São Paulo, Brazil). Female rats with blood glucose concentrations >120 mg/dL were used as the GDM model [24]. During pregnancy, female rats were housed in separate cages until the end of the experiment. After one-week, non-pregnant rats from all groups were euthanized following ethical aspects.

Glucose and insulin tolerance tests

On gestational day 18, oral glucose tolerance test (OGTT) was conducted between 13:00 and 14:00 h. Rats were fasted for 6h before OGTT, and a glucose solution with 2 g/kg body weight was administered by intragastric gavage. Blood samples were taken from the tip of the tail at 0 (baseline), 15, 30, 60, and 120 min after glucose administration using a glucose meter (ACCU-CHEK, Roche, Germany).

Insulin tolerance tests (ITT) were performed on 6-h fasted offspring. They received an intraperitoneal injection of 0,75UI/kg insulin and blood samples from the tip of the tail were taken at times 0 (baseline), 15, 30, 60, 90, and 120 min, using a glucose meter (ACCU-CHEK, Roche, Germany) [25].

Hematological, biochemical and cytokine analyses in dams

At the end of the experimental period, blood samples collected from dams were used for hematological analyses (EDTA tubes) and biochemical assays. The parameters included erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and total and differentiated leukocytes (hematology analyzer SK 9600, HoffmannLab,

São Paulo, SP, Brazil). The samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes for the biochemical analyses. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine, urea, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were measured. These parameters were measured with specific kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil), according to the manufacturer's recommendations, using the AMA-B-280 S automatic biochemical analyzer (Ama Medical, Brazil).

Cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10) in serum samples were determined using the Milliplex 7-plex kit (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). 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 detection limit of the assay were recorded as zero. In contrast, samples above the highest quantification limit of the standard curve were assigned to the highest value on the curve. Reading was performed on a CytoFLEX cytometer (São Paulo, SP, Brazil).

Gut Microbiota Assessment in dams

Fecal samples were collected on day 19 of gestation. Fecal samples were immediately placed in sterile tubes for rapid freezing and then transferred to a -80°C refrigerator for storage until DNA extraction. DNA was extracted using an exclusive magnetic bead method (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). Library preparation was performed using Neoprosecta's NGS protocol [26, 27]. Bacterial diversity was assessed by high-throughput sequencing of the 16S rRNA V3/V4 region using primers 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Libraries were quantified using the Qubit fluorometric system and by qPCR from standard curves using the Colibri Library Quantification Kit (Invitrogen, USA). The samples were sequenced using the NextSeq P1

600-cycle kit with 2 x 305 bp paired-end reactions. After sequencing, the sequences were analyzed using a proprietary pipeline (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). Briefly, the sequences were demultiplexed and subjected to a quality filter based on the sum of the error probabilities of the DNA bases, allowing a maximum of 1% accumulated errors. The Illumina adapters and primers were removed from the DNA sequences. All 16s rRNA Illumina amplicon sequencing data provided in this study can be publicly obtained from the Sequence Read Archive (SRA) of The National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the accession number PRJNA1200614.

Determination of baseline cardiovascular and assessment of sympathetic tone in offspring

Rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) to implant polyethylene catheters into the femoral artery and femoral vein. The catheters were tunneled into the dorsal scapular region of the animal and ketoprofen (5 mg/kg) was injected subcutaneously. The rats underwent a surgical recovery period of 24 h, after which BP and HR were recorded in conscious animals by connecting the arterial cannula to a pressure transducer (ML866/P, AD Instruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia) as previously described [28]. Pulsatile arterial pressure (PAP) was recorded for 40 min under baseline conditions, and mean arterial pressure (MAP), systolic arterial pressure (SBP), diastolic arterial pressure (DBP), and HR values were selected from 10 min segments of the recording for each animal (LabChart TM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia).

Autonomic function was assessed by administration of atropine (2 mg/kg), a muscarinic antagonist that acts as a modulator of parasympathetic function, and a β -blocker called propranolol (10 mg/kg) to assess sympathetic autonomic function. Selected

sections of the baseline BP and HR recordings were used for frequency domain spectral analyses of SAP and Pulse Interval (PI). The SAP spectra were integrated into the LF (0.2-0.75 Hz) and HF (0.75-3 Hz) bands. The LF/HF ratio of the PI was used to assess the sympathovagal index. Analyses were performed using CardioSeries software (v.2.4; www.danielpenteado.com) [15].

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for most data analysis and R software (version 4.4.2) for gut microbiota analysis. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze the data normality. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation for parametric tests. One-way ANOVA and Tukey's post-test were used to compare the groups. Non-parametric results were expressed as median (maximum and minimum), and Kruskal-Wallis with Dunn's post-test was used to compare groups. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test was used to compare body weight during pregnancy and oral glucose tolerance test. The difference was considered significant when $p < 0.05$. Spearman's correlation was used to analyze gut microbiota diversity and biochemical and inflammatory data. The correlations were classified as bad ($r \leq 0.20$), weak (0.21–0.40), moderate (0.41–0.60), good (0.61–0.80) and excellent (0.81–1.00).

Sequences from the gut microbiota analyses were 'demultiplexed' using Bcl2fastq software (v2.17.1.14) and then cleaned using cutadapt (v1.9.1). Amplicon sequence variants (ASVs) were identified using Qiime2 DADA2 with a zero-noise OTU approach. Finally, the taxonomic assignment was performed using the Greengenes 13.8-nr99 base. After sequencing the gut microbiota samples, the sequences were imported into R software for statistical analyses, using specific packages. Alpha and beta diversities were

analyzed, with beta diversity analysis performed using the Unifrac and Bray-Curtis methods. Phyla, family, and genus analysis were performed using Maaslin2 package and Kruskal-Wallis statistical tests with Dunn's post-test, and $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Symbiotic nutraceutical formulation did not alter food consumption or gestational weight gain

At the end of the experiments, the CTL group was formed with $n = 9$ dams, the GDM group was formed with $n = 8$ dams, and the GDM+Nut group was formed with $n = 8$ dams. Food consumption throughout the experiment was not significantly different between groups (CTL: 25.39 ± 4.81 g; GDM: 16.79 ± 2.77 g; GDM+Nut: 16.29 ± 0.15 g, $p > 0.05$). Similarly, no significant differences were observed in gestational weight gain among the groups (CTL: 276.9 ± 33.31 g; GDM: 267.8 ± 19.09 g; GDM+Nut: 256.4 ± 23.57 g, $p = 0.41$, $F = 0.94$, **Figure 2A**).

Synbiotic nutraceutical improved glucose tolerance in dams

Blood glucose levels on days 0, 4 and 18 of gestation were higher in the GDM group compared to the CTL group (89.63 [81.38 - 90.38] vs. 187.6 [116.7 - 218.9] mg/ dL, $p = 0.003$, **Figure 2B**). The treatment with synbiotic nutraceutical reduced blood glucose levels (130 [115.9 - 140.6], $p < 0.05$, **Figure 2B**) when compared to the GDM group. In addition, the nutraceutical treatment reduced OGTT in GDM dams ($p = 0.0002$, **Figure 2C and D**).

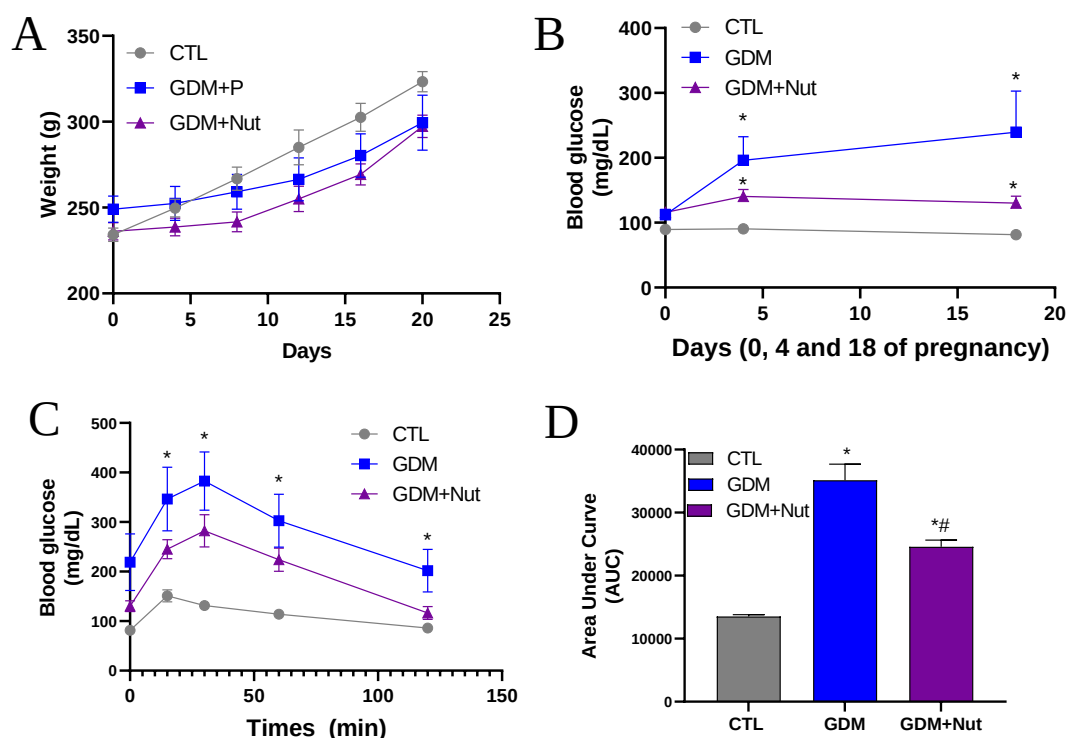


Figure 2. Gestational weight gain, glycaemia and glucose tolerance in healthy pregnant rats (CTL), rats with gestational diabetes mellitus (GDM) and rats with GDM treated with nutraceutical during pregnancy twice a day (GDM+Nut). (A) Body weight during pregnancy. (B) Glycemia on days 0, 4, and 18 of pregnancy. (C) Oral glucose tolerance test. (D) The area under the curve (AUC) was calculated as a glucose tolerance index. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni as a post hoc test or one-way ANOVA with Tukey as a post hoc test. * $p < 0.05$ vs O-CTL; # $p < 0.05$ vs O-GDM.

Synbiotic nutraceutical formulation did not affect hematological and lipid profile parameters but significantly reduced serum inflammatory cytokines in dams

Leukocytes and segmented leukocytes showed a significant increase in the GDM group compared to the CTL group, while no differences were observed between the GDM+Nut group and the CTL group (**Table 2**). Erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, and lymphocytes did not differ among groups (**Table 2**). The GDM group had elevated total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, serum creatinine, AST, and ALT compared to the CTL group (**Table 2**). No differences in these markers were observed between the GDM+Nut and CTL groups (**Table 2**). Inflammatory cytokine analysis

revealed a significant reduction in TNF- α and IL-6 levels in the GDM+Nut compared to the GDM group ($p<0.05$, **Table 2**), whereas IL-10 was significantly lower in the GDM group than in the CTL group ($p<0.05$, **Table 2**).

Table 2. Hematological, biochemical and inflammatory parameters of healthy pregnant rats (CTL), with GDM receiving vehicle (GDM), and with GDM treated with nutraceutical (GDM+Nut - lyophilized *L. fermentum* 139, 263, 296 and jabuticaba peel) twice a day during pregnancy.

Hematological parameters	CTL	GDM	GDM+Nut	p-value
Erythrocytes ($10^6 / \text{mm}^3$)	5.4 (5.2-5.8)	5.2 (5.1-5.5)	5.3 (5.2-5.5)	0.26
Hematocrit (%)	41.0 (40.8-43.0)	42.0 (41.3-42.5)	42.0 (40.8-42.7)	0.73
Hemoglobin (%)	13.8 (13.0-14.0)	12.9 (12.2-13.5)	13.7 (13.0-14.0)	0.03
MCV (%)	41.2 (40.6-42.7)	42.5 (41.5-44.0)	40.8 (39.7-42.0) [#]	0.01
MCH (%)	15.3 (14.9-15.6)	15.4 (14.8-16.0)	15.8 (15.0-16.4)	0.53
MCHC (%)	35.2 (34.9-35.6)	35.0 (34.7-35.3)	34.2 (33.5-35.2)	0.2
Leukocytes ($10^3 / \text{mm}^3$)	8.0 (7.9-8.2)	8.3 (8.2-8.5) [*]	8.3 (8.2-8.4)	0.01
Segmented (%)	53.4 (52.4-54.1)	57.9 (55.5-59.3) [*]	56.3 (54.2-58.9)	0.001
Lymphocytes (%)	33.5 (32.6-34.6)	34.5 (33.7-35.0)	32.3 (30.7-34.8)	0.09
Monocytes (%)	9.4 (9.2-9.8)	8.64 (8.30-8.8) [*]	8.3 (8.0-8.8) [*]	0.0005
Biochemical parameters				
Triglycerides (mg/dL)	103.3 (98.3-107.3)	195.4 (187.0-205.3) [*]	134.6 (128.4-142.4)	<0.0001
Total cholesterol (mg/dL)	109.8 (102.4-117.7)	219.4 (197.9-254.7) [*]	188.6 (165.5-199.7)	<0.0001
LDL-cholesterol (mg/dL)	21.9 (20.4-23.5)	92.1 (83.1-102.4) [*]	56.5 (49.6-58.3)	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	49.4 (46.0-52.9)	68.0 (61.3-78.9)	84.8 (79.1-89.8) [*]	<0.0001
Creatinine (mg/dL)	0.7 (0.6-0.8)	0.9 (0.8-1.1) [*]	0.7 (0.6-0.8)	0.008
Ureia (mg/dL)	31.1 (27.7-34.4)	35.4 (33.2-39.0)	33.2 (30.1-35.0)	0.08
AST (U/L)	44.5 (42.2-48.1)	70.3 (67.8-95.3) [*]	53.6 (51.5-58.3)	<0.0001

ALT (U/L)	44.1 (40.8-49.5)	72.3 (61.8-90.3)*	49.6 (45.3-52.3)	<0.0001
Cytokines levels				
TNF- α (pg/mL)	72.2 (69.7-76.5)	91.2 (86.4-97.1)	70.2 (68.3-74.7) [#]	0.0006
IL-1 β (pg/mL)	69.4 (67.4-74.9)	71.9 (68.6-77.3)	72.1 (65.2-75.4)	0.48
IL-6 (pg/mL)	51.5 (48.7-53.2)	65.1 (59.2-78.5)	46.2 (44.2-53.8) [#]	0.0003
IL-10 (pg/mL)	70.8 (68.0-74.2)	50.0 (48.7-53.3)*	65.2 (62.3-70.4)	<0.0001

Data are expressed as median (minimum – maximum) and analyzed by the Kruskal-Wallis test with Dunn as a post hoc test. MCV: Mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; IL: interleukin. (*) = $p < 0.05$ vs CTL group; (#) = $p < 0.05$ vs GDM group.

Synbiotic nutraceutical improves gut microbiota diversity and composition in dams

Analysis of gut microbiota clustering revealed significant differences in Bray-Curtis dissimilarity ($F=5.98$, $p=0.009$), but not in UniFrac distances ($F=1.31$, $p=0.29$) (**Figure 3 A and B**). The GDM group had lower richness and alpha diversity, as assessed by the Chao, Shannon, Simpson and Fisher indexes, compared to the CTL group ($p < 0.05$, **Figure 3C**). The nutraceutical treatment did not increase alpha diversity indexes (Chao: $p=0.11$; Shannon: $p=0.09$; Fisher: $p=0.11$). Relative abundance analysis identified 11 bacterial phyla, with Firmicutes, Actinomycetota, Proteobacteria, Bacteroidota, Bacillota, Fusobacteriota, and Tenericutes being the most abundant (**Figure 3D**). GDM rats showed a decrease in the relative abundance of Tenericutes and Bacteroidota ($p < 0.05$, **Figure 3D**). Treatment with the nutraceutical formulation increased Bacteroidota abundance compared to the GDM group ($p < 0.05$, **Figure 3D**). At family level, Clostridiaceae, Coriobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Erysipelotrichaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Oscillospiraceae were the most abundant (**Figure 3E**). The GDM group showed a decrease in the relative abundance of Lactobacillaceae, Helicobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Mycoplasmataceae, alongside an increased abundance of Pectobacteriaceae, Peptostreptococcaceae compared to the CTL group ($p < 0.05$). The

nutraceutical formulation decreased the relative abundance of Staphylococcaceae and increased Coprobacillaceae compared to the GDM group ($p < 0.05$). The most abundant genera identified are presented in **Figure 3F**, while a heatmap illustrating the top 20 genera is shown in **Figure 4A**. The GDM group showed a reduction in the relative abundance of the genus *Mycoplasma*, *Helicobacter*, *Anaerostignum*, *Faecalibaculum*, *Flintibacter*, *Ruminoclostridium*, *Phocaeicola*, *Clostridium*, *Butyricimonas*, *Bacteroides*, *Flavonifractor*, *Lactobacillus*, *Fusicatenibacter*, *Bifidobacterium*, *Roseburia* and *Ruminococcus* compared to the CTL group ($p < 0.05$). Conversely, the GDM group showed an increased relative abundance of the genera *Erysipeloclostridium* and *Romboutsia* compared to the CTL group ($p < 0.05$). Treatment with symbiotic nutraceutical increased the relative abundance of *Mediterraneibacter*, *Anaerostipes*, *Holdemania*, *Dysosmobacter*, *Flavonifractor*, *Phocaeicola*, and *Gemmiger* compared to the GDM group ($p < 0.05$, **Figure 4 B, C and D**).

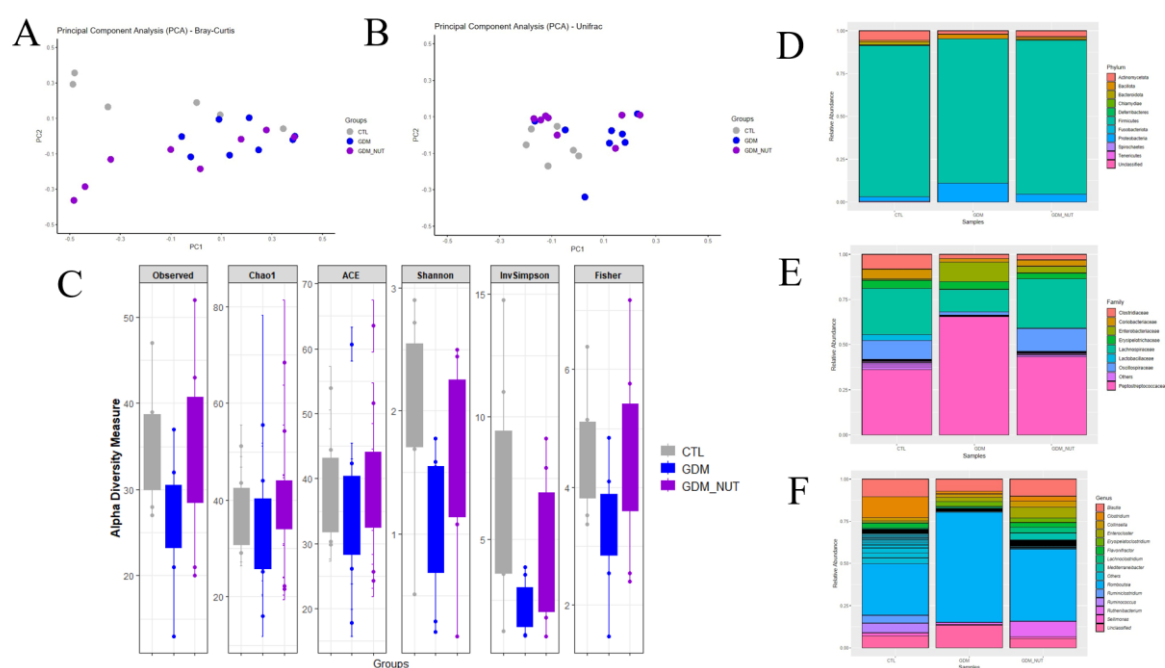


Figure 3. Administration of the nutraceutical containing freeze-dried jabuticaba peel and *L. fermentum* induces changes in the diversity and composition of the gut microbiota in GDM rats. (A) and (B) CoA analysis based on Bray-Curtis and Unifrac dissimilarity was used to represent the beta diversity of each group. (C) Alpha diversity was determined

using the Chao1 (Richness), ACE (Richness), Shannon (richness and evenness), Simpson and Fisher (number of species and the evenness). Relative abundance of bacterial microbiota composition at the (D) phylum, (E) families and (F) genus. Significance between groups was calculated using the non-parametric Kruskal-Wallis and Maaslin tests.

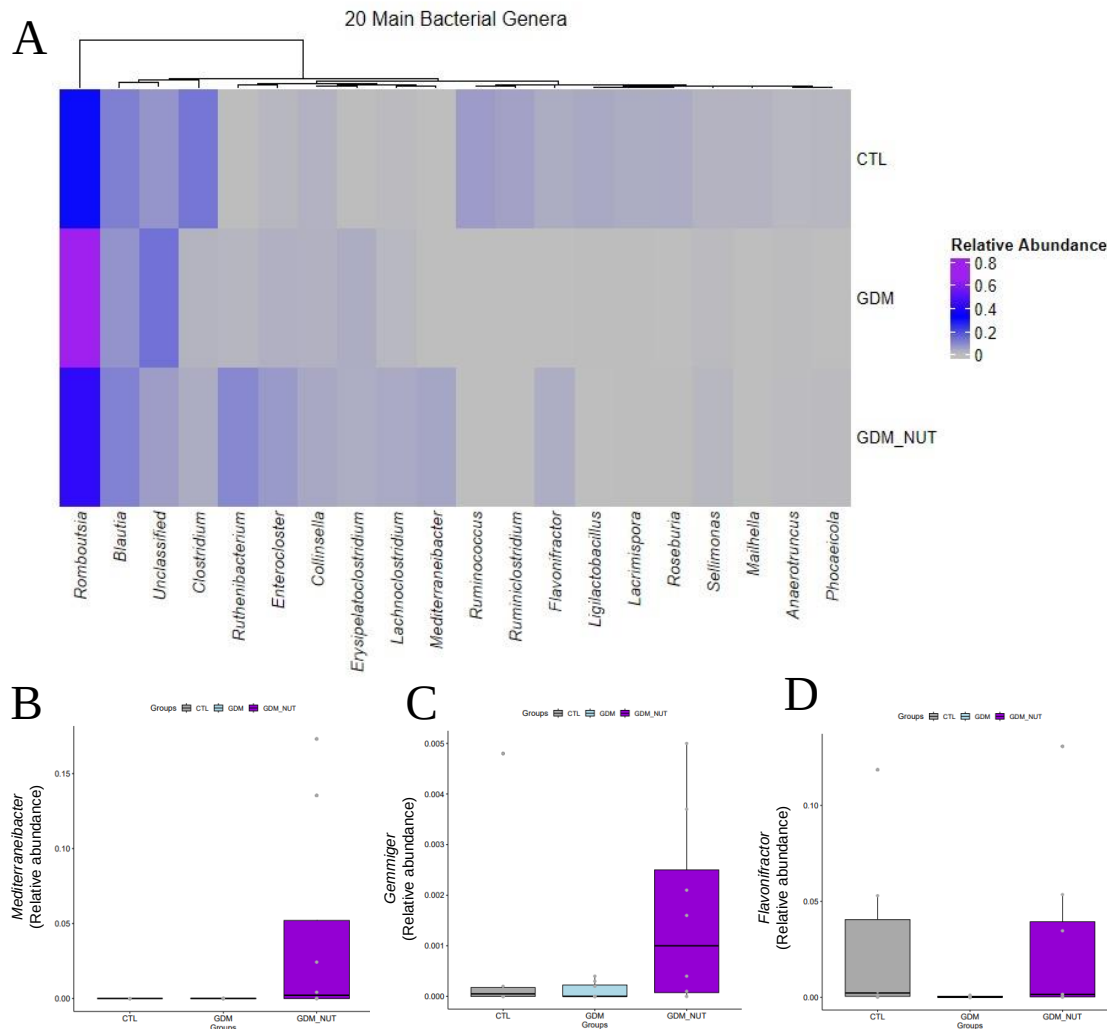


Figure 4. Effects of a mixed formulation freeze-dried Jabuticaba peel and *L. fermentum* on gut microbiota. Heatmap showing the relative abundance of microbial taxa at genus level. Groups: control group (CTL), gestational diabetes mellitus receiving vehicle (GDM), and GDM receiving formulation freeze-dried Jabuticaba peel and *L. fermentum* (GDM+Nut) twice a day during gestation.

Spearman correlation test (Table 3) shows significant negative associations between alpha diversity indices and biochemical and inflammatory variables in dams. A weak negative correlation was found between the AUC-OGTT and the Shannon index. A

moderate negative correlation trend was observed between Chao1, ACE, Shannon and Fisher indices and serum ALT, AST and IL-6 levels. Serum creatinine levels were negatively correlated with all alpha diversity indices. Serum IL-10 was positively correlated with Shannon's, Simpson's and Fisher's indices. When evaluating the lipid profile, a negative correlation was observed between triglycerides and LDL-c and the Fisher index and LDL-c and the Shannon index.

Table 3. Correlation of alpha diversity indices and biochemical and inflammatory parameters in dams.

	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Fisher
AUC-OGTT	-0.21	-0.20	-0.40*	-0.38	-0.26
ALT	-0.43*	-0.41*	-0.39*	-0.36	-0.46*
AST	-0.41*	-0.39*	-0.43*	-0.41*	-0.44*
Total cholesterol	-0.31	-0.31	-0.36	-0.30	-0.33
Tryglicerides	-0.33	-0.32	-0.36	-0.31	-0.37*
Creatinine	-0.54*	-0.52*	-0.52*	-0.49*	-0.56*
Ureia	-0.10	-0.09	-0.16	-0.16	-0.14
HDL-c	-0.11	-0.13	-0.16	-0.13	-0.10
LDL-c	-0.33	-0.33	-0.37*	-0.32	-0.37*
TNF- α	-0.29	-0.29	-0.32	-0.26	-0.36
IL-1B	-0.29	-0.29	-0.00	-0.05	-0.25
IL-6	-0.44*	-0.42*	-0.42*	-0.42*	-0.47*
Il-10	0.35	0.34	0.41*	0.37*	0.40*

Data are expressed Spearman's correlation coefficient (ρ) values analyzed by the Spearman's correlation. AUC-OGTT: Area under curve-Oral glucose tolerance test; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; LDL: low density lipoprotein-cholesterol; HDL: high density lipoprotein-cholesterol; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; IL: interleukin. (*) = $p < 0.05$

Synbiotic nutraceutical improved anthropometric parameters but limited metabolic improvements in offspring

The birth weight of the O-GDM group was significantly lower compared to the O-CTL group (**Table 4**). In contrast, the birth weight and length in the O-GDM+Nut group

were significantly higher compared to both the O-GDM and O-CTL groups ($p < 0.05$, **Table 4**). At the weaning period, male and female offspring in the O-GDM+Nut group showed higher body weight compared to those in the O-CTL group. By 60 days of age, female offspring in the O-GDM+Nut group showed a significant increase in body weight compared to females in both the O-GDM and O-CTL groups (**Table 4**).

Table 4. Weight and length of the offspring of the CTL (O-CTL), GDM (O-GDM) and GDM+Nut (O-GDM+Nut) groups from birth to adolescence.

	O-CTL	O-GDM	O-GDM+Nut	<i>p</i> -value
Birth				
Weight (g)	6.28 ± 0.45	5.60 ± 0.72*	6.90 ± 0.17*#	<0.0001
Length (cm)	4.37 ± 0.10	4.34 ± 0.33	4.74 ± 0.14*#	<0.0001
Weight (g) – 21 days				
Male	35.5 ± 8.45	35.77 ± 7.01	40.64 ± 3.40	0.0556
Female	32.64 ± 6.22	35.66 ± 0.81	40.35 ± 2.06*	<0.0001
Weight (g) – 60 days				
Male	215.37 ± 13.02	215.66 ± 36.98	235.87 ± 30.05	0.2818
Female	154.5 ± 10.96	164.5 ± 9.35	186.25 ± 19.94*#	0.0012

Data are expressed as mean ± standard deviation and analyzed by one-way ANOVA with Tukey as a post hoc test. (*) = $p < 0.05$ vs O-CTL; (#) = $p < 0.05$ vs O-GDM.

The OGTT results for the offspring of control dams, GDM dams, and GDM dams treated with the nutraceutical formulation are presented in **Figure 5A**. Analysis of the AUC showed a significant increase in O-GDM and O-GDM+Nut groups compared to the O-CTL group ($p < 0.0001$, $F = 17.04$, **Figure 5B**). However, no significant glycemic variations were observed among the groups in the ITT ($p > 0.05$, **Figure 5D**).

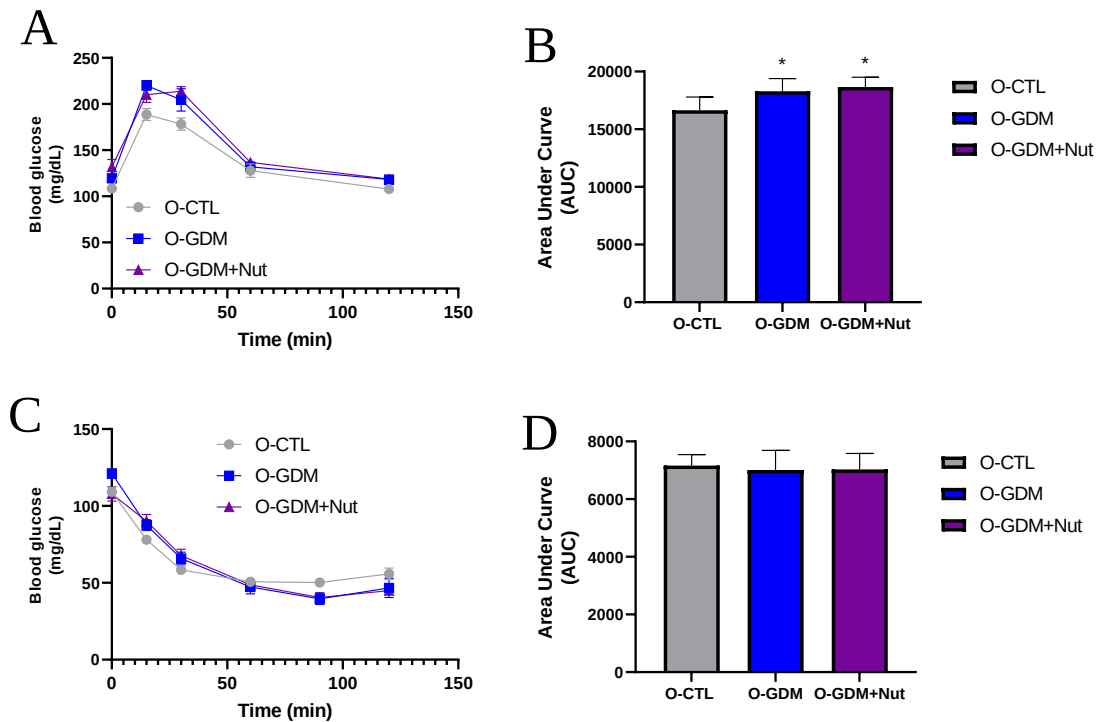


Figure 5. Glucose and insulin tolerance of the offspring of healthy rats (O-CTL), rats with GDM (O-GDM) and rats with GDM treated with a nutraceutical formulation of *L. fermentum* and jabuticaba peel (GDM+Nut). (A) Oral glucose tolerance test. (C) Insulin tolerance test. (B) and (D) The area under the curve (AUC) was calculated as an index of glucose tolerance or insulin tolerance for each test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed by one-way ANOVA test with Tukey as post hoc test. (*) = $p < 0.05$ vs O-CTL.

Improved cardiovascular health in offspring of GDM dams treated with symbiotic nutraceutical

Male and female offspring in the O-GDM group had an increase in SBP (155.6 ± 11.6 vs. 171.7 ± 12.4 mmHg, $p < 0.0001$, **Figure 6A**), DBP (104.4 ± 8.1 vs. 115.6 ± 13.1 mmHg, $p = 0.03$, **Figure 6B**) and MAP (121.3 ± 8.9 vs. 134.3 ± 12.6 mmHg, $p < 0.0001$, **Figure 6C**) compared to the O-CTL group. The administration of nutraceuticals in GDM dams (O-GDM+Nut) significantly reduced SBP (151.6 ± 15.4 mmHg, $p < 0.0001$, **Figure 6A**), DBP (103.1 ± 11.7 mmHg, $p = 0.01$, **Figure 6B**) and MAP (118.8 ± 11.0 mmHg, $p < 0.0001$, **Figure 6C**) compared to the O-GDM group. Maternal treatment with the symbiotic formulation also reduced HR in the O-GDM+Nut (372.3 ± 23.68 bpm)

compared to both the O-CTL (402.3 ± 21.67 bpm, $p < 0.0001$) and O-GDM (395.8 ± 32.01 bpm, $p = 0.05$) groups (**Figure 6D**).

Spectral analysis revealed that the O-GDM group had a significant increase in LF/HF ratio compared to the O-CTL (0.28 ± 0.18 vs 0.15 ± 0.08 , $p = 0.05$, **Figure 6E**). On the other hand, the O-GDM+Nut group showed a significant reduction in LF/HF ratio compared to the O-GDM group (0.17 ± 0.07 , $p = 0.01$, **Figure 6E**).

Figures 6F and G illustrated changes in HR in response to the administration of methylatropine (vagal tone) and propranolol (sympathetic stimulus). Vagal tone was significantly decreased in the O-GDM group compared to the O-CTL group (78.9 ± 21.8 vs. 53.7 ± 21.2 bpm, $p = 0.03$, **Figure 6F**). However, vagal tone in the O-GDM+Nut group was significantly higher compared to the O-GDM group (78.8 ± 26.0 bpm, $p = 0.02$, **Figure 6F**). For sympathetic stimulation, a significant increase was observed in the O-GDM compared to the O-CTL group (-90.5 ± 37.8 vs. -58.4 ± 23.5 , $p = 0.03$, **Figure 6G**). The O-GDM+Nut group showed a significant reduction in cardiac sympathetic stimulation compared to the O-GDM group (56.6 ± 22.4 , $p = 0.01$, **Figure 6G**).

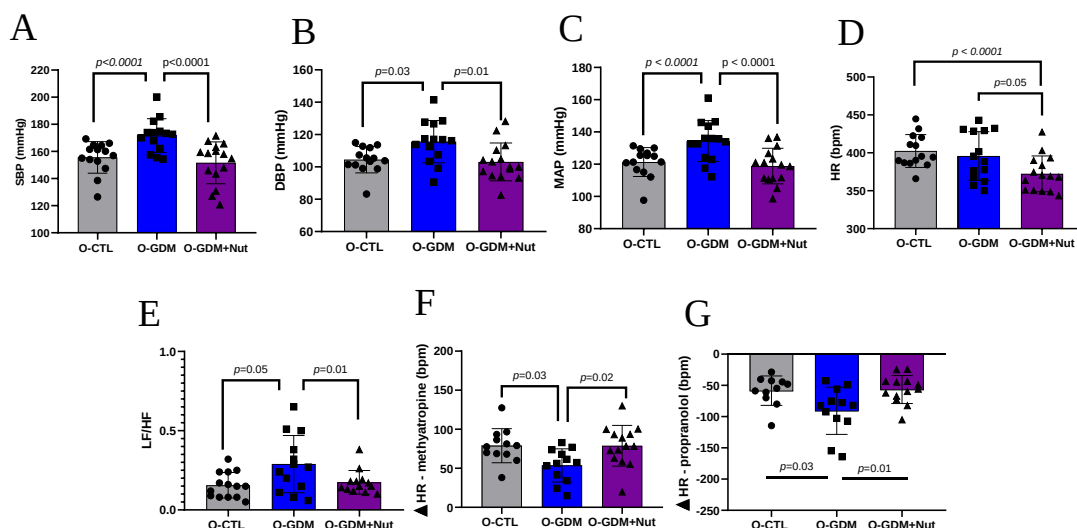


Figure 6. Cardiovascular health parameters of the offspring of healthy rats (O-CTL), rats with GDM (O-GDM), and rats with GDM treated with a nutraceutical formulation of *L. fermentum* and jabuticaba peel (GDM+Nut). The distributed dots on the graph represent the animals. (A) SBP – Systolic Blood Pressure. (B) DBP – Diastolic Blood Pressure. (C)

MAP – Mean Arterial Pressure. (D) HR – Heart Rate. (E) Low-Frequency/High-Frequency ratio. (F) Evaluation of parasympathetic function. (G) Evaluation of sympathetic function. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed by one-way ANOVA test with Tukey as a post hoc test.

4. Discussion

This study showed that administering a synbiotic nutraceutical containing *L. fermentum* strains and jabuticaba peel twice daily during pregnancy promoted improvement in glucose tolerance, reduced inflammation, and modulated the gut microbiota in dams with GDM. Furthermore, maternal nutraceutical intervention protects offspring against increased blood pressure and autonomic dysfunction later in life.

In a previous study using an animal model of GDM induced by streptozotocin and a high-fat and high-sugar diet, the oral administration of galactooligosaccharide at low and high doses (0.9g/kg and 1.8g/kg, respectively, for 30 days) did not alter gestational weight gain [29], like the results found in this study. The consumption of probiotics and prebiotics, alone or together, has been studied in recent years regarding their physiological functions in health and disease, with glycemic control in GDM being one of the many benefits reported in the literature [9, 30, 31].

Although this study showed that administering the synbiotic nutraceutical containing *L. fermentum* and jabuticaba peel could not reduce fasting glycemia, an improvement in glucose tolerance was observed. The reduction in glucose tolerance in pregnant women with GDM is associated with an improvement in glucose metabolism, which implies a decrease in glycemic peaks and the risk of developing chronic non-communicable diseases in their offspring [32]. A study showed that the supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* LCG (5 x 10⁸ CFU/10g) and *Bifidobacterium animalis* subsp.

lactis Bb12 (1×10^9 CFU/10g) at a low and high dose (0.5g/day and 1g/day, for fifteen days) reduced significantly fasting glycemia in rats with GDM [33]. Additionally, preclinical studies have also shown that jabuticaba may exert health benefits on insulin sensitivity, glucose and lipid metabolism, and decrease inflammation [34, 35]. Anthocyanins, essential components of fruits, provide protection and exhibit anti-diabetic, anti-obesity, and anti-inflammatory effects [36].

Changes in blood cells, including monocytes, have been observed in diabetes mellitus [37, 38]. Monocytes may play a key role related to chronic inflammation in disease. Patients with type 2 diabetes mellitus have reduced levels of type 2 monocytes [38]. The hematological results of this study suggest that the tested nutraceutical may be safe for human consumption.

Previous studies have reported anti-inflammatory effects of probiotic consumption and jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) [39, 40]. Anthocyanins from jabuticaba protect against inflammation and interact with the gut microbiota [41]. Because of low absorption, polyphenols like anthocyanins reach the intestine, where the gut microbiota metabolizes them [42]. Proposed mechanisms by which phenolic compounds reduce the expression of pro-inflammatory cytokines involve inhibiting pro-inflammatory NF- κ B pathways and decreasing the expression of adhesion molecules [41, 43]. In addition, the increased abundance of bacterial genera and families that produce SCFA may exert an anti-inflammatory effect [44]. SCFA binds to G protein-coupled receptors (GPCRs) and activates histone deacetylase (HDAC), inhibiting NF- κ B signaling and pro-inflammatory cytokines [45].

Changes in the composition or diversity of the gut microbiota can lead to beneficial metabolic changes, enhancing nutrient metabolism, insulin sensitivity, and hormone production [46]. In this study, treatment with the nutraceutical in female rats with GDM

successfully increased the diversity and modified the composition of gut microbiota by boosting the relative abundance from the genera *Mediterraneibacter*, *Anaerostipes*, *Flavonifractor*, *Holdemania*, *Dysosmobacter*, *Phocaeicola*, and *Gemmiger*, while reducing the abundance of *Romboutsia*.

Mediterraneibacter, *Anaerostipes*, *Flavonifractor* and *Dysosmobacter* are associated with increased production of SCFA in the gut, particularly butyrate [47-49]. A previous study indicated that species of the genus *Dysosmobacter* were more abundant in patients taking metformin and showed a negative correlation with fasting glucose levels in subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus [50]. In addition, it was demonstrated that *Dysosmobacter welbionis* J115 supplementation (1×10^9 CFU/0.2 mL for six weeks) was negatively correlated with BMI, HbA1c, and fasting glucose in mice fed an HFD [51].

Administration of *Phocaeicola vulgatus*, recently renamed as *Bacteroides vulgatus* (1×10^9 CFU/100 μ L) for six weeks reduced triglycerides and hepatic steatosis in C57BL/6J mice through the production of metabolites, such as 3-HPAA, which plays a protective role by reducing fatty acid metabolism by liver cells and inhibiting hepatic steatosis [52]. In addition, bacteria of the genus *Phocaeicola* are among the main colonizing microorganisms in the infant's intestine during vertical transmission [53]. *Phocaeicola faecalis* FXJYN30E22 showed beneficial effects in the treatment of ulcerative colitis, such as anti-inflammatory effects, with the increase in the concentration of junctional proteins such as ZO-1, claudin-1 and occludin and SCFA such as acetate and butyrate [54].

Japanese pregnant women with GDM exhibited a higher relative abundance of *Romboutsia* than those without GDM [55]. Otherwise, anti-diabetic medications, such as Metformin and Liraglutide, decreased the relative abundance of *Romboutsia* in patients

with type 2 diabetes mellitus [56, 57]. Here we have shown that female rats with GDM had a higher relative abundance of *Romboutsia*, and the nutraceutical administration decreased the relative abundance of *Romboutsia* to a similar extent as the control group. Taken together, the results of this study suggest that administering nutraceutical containing *L. fermentum* and jabuticaba peel improves glycemic control in rats with GDM by modulating the diversity and composition of the gut microbiota.

The gut microbiota is closely linked to the immune system [58]. The development of autoimmune diseases has been associated with gut dysbiosis and decreased abundance from the genera *Gemmiger*, *Anaerostipes*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Alistipes* and *Faecalibacterium* [59]. These bacterial genera have been linked to butyrate production and anti-aging and anti-inflammatory effects [60]. The abundance of *Gemmiger* was diminished in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy, showing a negative correlation with HbA1c and fasting glycemia [61]. The importance of butyrate in GDM is highlighted by the capacity of intestinal L-cells to utilize SCFA as cellular energy. It is also associated with the production of GLP-1, an insulintropic hormone relevant for glucose metabolism [30].

In this study, we demonstrated the intimate relationship between gut microbiota alpha diversity indices and biochemical and inflammatory parameters. We found that inadequate glycemic control may be negatively associated with the Shannon index. In addition, the increase in serum levels of biochemical parameters such as ALT, AST and creatinine in GDM rats may be negatively associated with alpha diversity indices. The association between elevated inflammatory cytokines, especially IL-6, with the onset of GDM and intestinal dysbiosis has been shown in previous studies [3, 62]. In this study, we observed that the increase in serum IL-6 is closely related to the diversity of the

composition of the gut microbiota through a decrease in Chao1, ACE, Shannon, Simpson and Fisher index.

The hyperglycemic intrauterine environment can influence pro-apoptotic phenomena associated with oxidative stress and inflammation, leading to malformations in the cardiovascular, renal, and central nervous systems [63]. Impaired gut microbiota composition can alter placental structure and function, particularly nutrient transport [64, 65]. In addition, gut microbiota-derived lipopolysaccharide (LPS) particles can cross the placenta via toll-like receptors (TLR) 2 and TLR4, reach fetal tissues, activate inflammatory pathways leading to alterations in fetal development [66], and increase the risk of developing cardiovascular disease such as arterial hypertension later in life [67].

Our results support previous studies showing that GDM is a risk factor for arterial hypertension in the offspring later in life due to endothelial dysfunction, and sympathetic hyperactivity [68-70]. GDM may decrease the concentration and bioavailability of nitric oxide to interact with the vascular endothelium of the offspring, impairing endothelium-dependent vasodilation and increasing vasoconstriction. Such changes are characterized as endothelial dysfunction [71].

Previous studies have shown that maternal therapy with probiotics and polyphenols can protect against the development of hypertension in offspring [72, 73]. Although consistent beneficial effects have been reported with the administration of probiotics, polyphenols, and fiber in GDM conditions [9, 74], their impacts on the offspring of dams with GDM are poorly understood. Here, we showed for the first time that administering a nutraceutical containing probiotics and jabuticaba prevents arterial hypertension and cardiac autonomic dysfunction in male and female offspring later in life. While these findings are promising, the study's preclinical nature necessitates caution when

extrapolating to human populations. Future clinical trials will be essential to validate the efficacy and safety of this synbiotic nutraceutical during pregnancy.

Conclusion

The administration of a synbiotic nutraceutical containing the potentially probiotic strains *L. fermentum* 136, *L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296 combined with jabuticaba peel, significantly improved glucose tolerance, reduced low-grade inflammation, and modulated the gut microbiota in rats with GDM. In addition, the results show that synbiotic nutraceutical administration to dams mitigated cardiac autonomic dysfunction in their male and female offspring. These findings suggest the potential of this synbiotic nutraceutical as a therapeutic approach for managing GDM and its associated long-term complications, although further studies, particularly in humans, are warranted to validate these effects.

References

1. Farahvar, S., A. Walfisch, and E. Sheiner, *Gestational diabetes risk factors and long-term consequences for both mother and offspring: a literature review*. Expert Rev Endocrinol Metab, 2019. **14**(1): p. 63-74.
2. de Mendonca, E., et al., *Gestational Diabetes Mellitus: The Crosslink among Inflammation, Nitroxidative Stress, Intestinal Microbiota and Alternative Therapies*. Antioxidants (Basel), 2022. **11**(1).
3. Pinto, Y., et al., *Gestational diabetes is driven by microbiota-induced inflammation months before diagnosis*. Gut, 2023. **72**(5): p. 918-928.
4. Crusell, M.K.W., et al., *Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum*. Microbiome, 2018. **6**(1): p. 89.
5. Zhou, L., et al., *Probiotics and synbiotics show clinical efficacy in treating gestational diabetes mellitus: A meta-analysis*. Prim Care Diabetes, 2021. **15**(6): p. 937-947.
6. Wickens, K.L., et al., *Early pregnancy probiotic supplementation with Lactobacillus rhamnosus HN001 may reduce the prevalence of gestational diabetes mellitus: a randomised controlled trial*. Br J Nutr, 2017. **117**(6): p. 804-813.
7. Miao, M., et al., *The Protective Effects of Inulin-Type Fructans Against High-Fat/Sucrose Diet-Induced Gestational Diabetes Mice in Association With Gut Microbiota Regulation*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 832151.
8. Wan, J., et al., *Effects of galactooligosaccharides on maternal gut microbiota, glucose metabolism, lipid metabolism and inflammation in pregnancy: A randomized controlled pilot study*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1034266.
9. Mu, J., et al., *The Effects of Probiotics/Synbiotics on Glucose and Lipid Metabolism in Women with Gestational Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. Nutrients, 2023. **15**(6).
10. Karamali, M., et al., *The Effects of Synbiotic Supplementation on Pregnancy Outcomes in Gestational Diabetes*. Probiotics Antimicrob Proteins, 2018. **10**(3): p. 496-503.
11. Wan, J. and J. Ma, *Efficacy of dietary supplements targeting gut microbiota in the prevention and treatment of gestational diabetes mellitus*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 927883.
12. de Souza, E.L., et al., *Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities - A review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019. **59**(10): p. 1645-1659.
13. Costa, P.C.T., et al., *Nutraceuticals in the management of autonomic function and related disorders: A comprehensive review*. Pharmacol Res, 2024. **208**: p. 107368.
14. da Silva, J.Y.P., et al., *Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jabuticaba Peel and Limosilactobacillus fermentum Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota*. Probiotics Antimicrob Proteins, 2024. **16**(5): p. 1773-1789.
15. de Araujo Henriques Ferreira, G., 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 Antimicrob Proteins, 2022. **14**(2): p. 349-359.
16. de Luna Freire, M.O., 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 Antimicrob Proteins*, 2023. **15**(3): p. 601-613.
17. Inada, K.O.P., et al., *Jaboticaba berry: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products*. *Food Res Int*, 2021. **147**: p. 110518.
 18. Quatrin, A., et al., *The Hepatoprotective Effect of Jaboticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis*. *J Nutr Metab*, 2018. **2018**: p. 9794629.
 19. Dragano, N.R., et al., *Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice*. *Br J Nutr*, 2013. **110**(3): p. 447-55.
 20. Lenquiste, S.A., et al., *Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats*. *Food Research International*, 2012. **49**(1): p. 153-160.
 21. Chatzakis, C., P. Cavoletto, and A. Sotiriadis, *Gestational Diabetes Mellitus Pharmacological Prevention and Treatment*. *Curr Pharm Des*, 2021. **27**(36): p. 3833-3840.
 22. Johns, E.C., et al., *Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications*. *Trends Endocrinol Metab*, 2018. **29**(11): p. 743-754.
 23. Garcia, E.F., et al., *Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected Lactobacillus Strains*. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 1371.
 24. Xu, W., et al., *Anti-inflammatory activities of puerarin in high-fat diet-fed rats with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus*. *Mol Biol Rep*, 2020. **47**(10): p. 7537-7546.
 25. Cavalcante, R.G.S., et al., *The probiotic Lactobacillus fermentum 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2019. **29**(12): p. 1408-1417.
 26. Christoff, A.P., et al., *Uncovering the hidden microbiota in hospital and built environments: New approaches and solutions*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019. **244**(6): p. 534-542.
 27. Freitas, C.F., et al., *Bacterial microbiota shifts in vacuum-packed beef during storage at different temperatures: Impacts on blown pack spoilage*. *Food Microbiol*, 2024. **119**: p. 104448.
 28. Guimaraes, K.S.L., et al., *Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring*. *Br J Nutr*, 2017. **118**(11): p. 930-941.
 29. Wan, J., et al., *Effect of Galactooligosaccharide on PPARs/PI3K/Akt Pathway and Gut Microbiota in High-Fat and High-Sugar Diet Combined with STZ-Induced GDM Rat Model*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023.
 30. de Albuquerque Lemos, D.E., J.L. de Brito Alves, and E.L. de Souza, *Probiotic therapy as a promising strategy for gestational diabetes mellitus management*. *Expert Opin Biol Ther*, 2024. **24**(11): p. 1207-1219.
 31. Cetinkaya Ozdemir, S., et al., *The effect of probiotic and synbiotic use on glycemic control in women with gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022. **194**: p. 110162.
 32. Moon, J.H. and H.C. Jang, *Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications*. *Diabetes Metab J*, 2022. **46**(1): p. 3-14.
 33. Zheng, Q.X., et al., *Probiotic supplements alleviate gestational diabetes mellitus*

- by restoring the diversity of gut microbiota: a study based on 16S rRNA sequencing. *J Microbiol*, 2021. **59**(9): p. 827-839.
34. Moura, M.H.C., et al., *Phenolic-rich jaboticaba (Plinia jaboticaba (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice*. *Food Res Int*, 2018. **107**: p. 48-60.
 35. Donado-Pestana, C.M., et al., *Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications*. *Current Opinion in Food Science*, 2018. **19**: p. 42-49.
 36. Sivamaruthi, B.S., P. Kesika, and C. Chaiyasut, *The Influence of Supplementation of Anthocyanins on Obesity-Associated Comorbidities: A Concise Review*. *Foods*, 2020. **9**(6).
 37. Fadini, G.P., et al., *Acute Effects of Linagliptin on Progenitor Cells, Monocyte Phenotypes, and Soluble Mediators in Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. **101**(2): p. 748-56.
 38. Fadini, G.P., et al., *An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy*. *Diabetologia*, 2013. **56**(8): p. 1856-66.
 39. do Carmo, M.A.V., et al., *Ellagitannins from jaboticaba (Myrciaria jaboticaba) seeds attenuated inflammation, oxidative stress, aberrant crypt foci, and modulated gut microbiota in rats with 1,2 dimethyl hydrazine-induced colon carcinogenesis*. *Food Chem Toxicol*, 2021. **154**: p. 112287.
 40. de Luna Freire, M.O., 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*, 2021. **10**(9).
 41. Morais, C.A., et al., *Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota*. *J Nutr Biochem*, 2016. **33**: p. 1-7.
 42. McGhie, T.K. and M.C. Walton, *The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding*. *Mol Nutr Food Res*, 2007. **51**(6): p. 702-13.
 43. Noratto, G.D., et al., *Polyphenolics from acai (Euterpe oleracea Mart.) and red muscadine grape (Vitis rotundifolia) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(14): p. 7999-8012.
 44. Markowiak-Kopeć, P. and K. Slizewska, *The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome*. *Nutrients*, 2020. **12**(4).
 45. He, J., et al., *Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
 46. Fan, Y. and O. Pedersen, *Gut microbiota in human metabolic health and disease*. *Nat Rev Microbiol*, 2021. **19**(1): p. 55-71.
 47. Xiong, L., et al., *The pharmacological mechanism of Xiaoyaosan polysaccharide reveals improvement of CUMS-induced depression-like behavior by carbon source-triggered butyrate-producing bacteria*. *J Appl Microbiol*, 2023. **134**(4).
 48. Liu, D., et al., *Anaerostipes hadrus, a butyrate-producing bacterium capable of metabolizing 5-fluorouracil*. *mSphere*, 2024. **9**(4): p. e0081623.
 49. Van Meijel, R.L.J., et al., *Mild intermittent hypoxia exposure alters gut microbiota composition in men with overweight and obesity*. *Benef Microbes*,

2022. **13**(4): p. 355-364.
50. Hase, E.M., et al., *Impact of metformin and Dysosmobacter welbionis on diet-induced obesity and diabetes: from clinical observation to preclinical intervention*. Diabetology, 2024. **67**(2): p. 333-345.
 51. Le Roy, T., et al., *Dysosmobacter welbionis is a newly isolated human commensal bacterium preventing diet-induced obesity and metabolic disorders in mice*. Gut, 2022. **71**(3): p. 534-543.
 52. Garcia-Lopez, M., et al., *Analysis of 1,000 Type-Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 2083.
 53. Shi, X., et al., *Delivery mode and maternal gestational diabetes are important factors in shaping the neonatal initial gut microbiota*. Front Cell Infect Microbiol, 2024. **29**(14): p. 1397675.
 54. Sun, Z., et al., *Novel Phocaeicola Strain Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Mice*. Curr Microbiol, 2022. **79**(12): p. 393.
 55. Tanaka, K., et al., *The gut microbiota of non-obese Japanese pregnant women with gestational diabetes mellitus*. Biosci Microbiota Food Health, 2022. **41**(1): p. 4-11.
 56. Gao, Y., et al., *Metformin-induced changes of the gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a prospective cohort study*. Endocrine, 2024. **85**(3): p. 1178-1192.
 57. Kant, R., et al., *Gut microbiota interactions with anti-diabetic medications and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. World J Methodol, 2022. **12**(4): p. 246-257.
 58. Levy, M., et al., *Dysbiosis and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 219-232.
 59. Wang, T., et al., *Autoimmune diseases exhibit shared alterations in the gut microbiota*. Rheumatology (Oxford), 2024. **63**(3): p. 856-865.
 60. Sang, J., et al., *Convergent and Divergent Age Patterning of Gut Microbiota Diversity in Humans and Nonhuman Primates*. mSystems, 2022. **7**(4): p. e0151221.
 61. Lu, X., J. Ma, and R. Li, *Alterations of gut microbiota in biopsy-proven diabetic nephropathy and a long history of diabetes without kidney damage*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 12150.
 62. Hasain, Z., et al., *Gut Microbiota and Gestational Diabetes Mellitus: A review of Host-Gut Microbiota Interactions and Their Therapeutic Potential*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **15**(10). p. 188.
 63. Armengaud, J.B., et al., *Offspring of mothers with hyperglycaemia in pregnancy: The short term and long-term impact. What is new?* Diabetes Res Clin Pract, 2018. **145**: p. 155-166.
 64. Lopez-Tello, J., et al., *Maternal gut microbiota Bifidobacterium promotes placental morphogenesis, nutrient transport and fetal growth in mice*. Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(7): p. 386.
 65. Pronovost, G.N., et al., *The maternal microbiome promotes placental development in mice*. Sci Adv, 2023. **9**(40): p. eadk1887.
 66. Brown, A.G., et al., *The tracking of lipopolysaccharide through the feto-maternal compartment and the involvement of maternal TLR4 in inflammation-induced fetal brain injury*. Am J Reprod Immunol, 2019. **82**(6): p. e13189.
 67. Falkner, B., *Maternal and gestational influences on childhood blood pressure*. Pediatr Nephrol, 2020. **35**(8): p. 1409-1418.
 68. Miranda, J.O., et al., *Maternal Diabetes Mellitus as a Risk Factor for High Blood*

- Pressure in Late Childhood*. Hypertension, 2019. **73**(1): p. e1-e7.
69. Yang, L., et al., *Gestational diabetes causes hyperactivity of the sympathetic nervous system and hypertension in adult mice offspring*. Clin Exp Hypertens, 2024. **46**(1): p. 2402260.
 70. Luo, H., et al., *Exposure to Maternal Diabetes Mellitus Causes Renal Dopamine D(1) Receptor Dysfunction and Hypertension in Adult Rat Offspring*. Hypertension, 2018. **72**(4): p. 962-970.
 71. Yu, C., et al., *Exposure to maternal diabetes induces endothelial dysfunction and hypertension in adult male rat offspring*. Microvasc Res, 2021. **133**: p. 104076.
 72. Guimaraes, K.S.L., et al., *Lactiplantibacillus plantarum WJL administration during pregnancy and lactation improves lipid profile, insulin sensitivity and gut microbiota diversity in dyslipidemic dams and protects male offspring against cardiovascular dysfunction in later life*. Food Funct, 2020. **11**(10): p. 8939-8950.
 73. Hsu, C.N., et al., *Maternal resveratrol therapy protected adult rat offspring against hypertension programmed by combined exposures to asymmetric dimethylarginine and trimethylamine-N-oxide*. J Nutr Biochem, 2021. **93**: p. 108630.
 74. Pheiffer, C., et al., *Gestational Diabetes and the Gut Microbiota: Fibre and Polyphenol Supplementation as a Therapeutic Strategy*. Microorganisms, 2024. **12**(4).

Supplementary Table 1.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson	Fisher
CTL_1	36	36	36.438688	2.0392197	0.78461244	4.642793669	4.697412807
CTL_2	47	51.2	53.95880489	2.717974483	0.90931812	11.0275614	6.388996587
CTL_4	38	43.6	44.39501966	1.693107614	0.72737734	3.668073666	4.998941601
CTL_5	27	29	30.2817508	0.511925121	0.20031	1.250484563	3.377761647
CTL_6	39	39	39.41979865	2.902400836	0.93230768	14.77272459	5.150753622
CTL_7	28	29	29.86374617	1.752565824	0.72209884	3.598401676	3.521174456
CTL_8	34	36.5	39.28855582	1.363449015	0.51707616	2.070719888	4.398759148
CTL_9	24	34.5	36.98828125	1.290215453	0.65673148	2.913171298	2.952801091
CTL_11	29	30.2	32.73774436	1.298822214	0.58655612	2.418707951	3.665431924
GDM_2	29	34	33.93564089	1.534492801	0.64145474	2.789048166	3.665431924
GDM_3	14	16	19.77402937	0.211763468	0.07467682	1.080703501	1.60196559
GDM_4	34	39.25	40.2681	1.765090663	0.7407948	3.857947294	4.398759148
GDM_6	37	42.6	45.21398892	1.58518731	0.72154002	3.59118032	4.847824067
GDM_7	28	29.5	29.45903751	1.464415116	0.63185542	2.716324114	3.521174456
GDM_8	16	16	16.36039594	0.296382559	0.10664224	1.119372378	1.862991521
GDM_9	22	25.75	28.73995209	0.826527259	0.35813144	1.557951366	2.67412885

GDM_10	25	27.5	29.3627451	1.158263747	0.56936888	2.322173093	3.09355255
GDM_NUT_1	39	39.5	41.0432526	2.438463743	0.87326378	7.89040418	5.150753622
GDM_NUT_2	50	54	55.56349949	2.484170449	0.88953912	9.052978756	6.863617772
GDM_NUT_3	37	42.6	43.73157133	1.048496453	0.43370728	1.765871191	4.847824067
GDM_NUT_5	41	45.66666667	47.8757713	1.871832147	0.73308948	3.746573945	5.456416601
GDM_NUT_6	34	37.5	38.95211957	1.874098046	0.79558974	4.892122343	4.398759148
GDM_NUT_7	20	21.5	22.79365079	0.18452282	0.05617658	1.059520223	2.399420085
GDM_NUT_8	30	30	30	2.190533499	0.84558102	6.475887873	3.81051499
GDM_NUT_9	17	17	17.63881237	1.150158	0.53082878	2.131418035	1.995374892
p-value all samples		p = 0.2039	p = 0.2166	p = 0.2166	p = 0.2171	p = 0.2171	p = 0.1297
p-value without outliers		p=0.13	p=0.15	p=0.02	p=0.03	p=0.12	p=0.05

APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO

EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY
https://doi.org/10.1080/14712598.2024.2409880



REVIEW



Probiotic therapy as a promising strategy for gestational diabetes mellitus management

Deborah Emanuelle de Albuquerque Lemos, José Luiz de Brito Alves and Evandro Leite de Souza

Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Gestational diabetes mellitus (GDM) has become the most common pregnancy medical complication, and its prevalence has increased in recent years. The GDM treatment primarily relies on adopting healthy eating habits, physical exercise, and insulin therapy. However, using probiotics to modulate the gut microbiota has been the subject of clinical trials as a promising therapeutic strategy for GDM management.

Areas covered: Due to the adverse effects of gut dysbiosis in women with GDM, strategies targeting the gut microbiota to mitigate hyperglycemia, low-grade inflammation, and adverse pregnancy outcomes have been explored. Probiotic supplementation may improve glucose metabolism, lipid profile, oxidative stress, inflammation, and blood pressure in women with GDM. Furthermore, decreased fasting blood glucose, insulin resistance, and inflammatory markers, such as TNF- α and CRP, as well as increased total antioxidant capacity, lipid profile modulation, and improved blood pressure in women with GDM, are some of the important results reported in the available literature.

Expert opinion: To fill the knowledge gap, further studies are needed focusing on modulating gut microbiota composition and metabolic activity and their systemic repercussions in GDM.

ARTICLE HISTORY

Received 4 May 2024
Accepted 24 September 2024

KEYWORDS

Diabetes mellitus;
pregnancy; gut microbiome;
modulation; probiotics

1. Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) has become the most common medical complication of pregnancy, and its prevalence has increased in recent years [1,2]. According to the International Diabetes Federation, one in six pregnant women is affected by GDM, posing an epidemic challenge worldwide [2,3].

GDM is a clinical condition primarily characterized by insulin resistance and pancreatic β -cell dysfunction, causing persistent hyperglycemia during pregnancy [4]. Hyperglycemia and metabolic alterations in pregnancy negatively impact the health of both mother and child and can affect quality of life in the short and long term [5,6].

Gut microbiota (GM) is essential in pregnancy health and GDM development [4,7–11]. Gut dysbiosis may contribute to GDM pathogenesis by promoting alterations in metabolic processes, such as insulin resistance, glucose intolerance, inflammation, oxidative stress, and deregulation of hormones, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [7,12].

GDM treatment relies on healthy eating habits, physical activity, and insulin therapy. However, clinical trials have shown that probiotics are a promising therapeutic strategy for controlling the glycemic and metabolic profile during pregnancy and reducing maternal and fetal harm risk [9,13–16].

Despite the beneficial effects of probiotics in managing GDM, it is still unclear which probiotic strains are most effective in this situation and what underlying mechanisms may be associated with improved glycemic control. Therefore, this

review aims to summarize and discuss the main results from available literature concerning clinical trials evaluating the use of probiotics for managing GDM.

2. Pathophysiology of gestational diabetes mellitus

In healthy pregnancies, the maternal body undergoes significant physiological changes to meet the needs of the growing fetus [17]. During the early pregnancy stages, there is an increase in insulin sensitivity and serum glucose, driving the growth in fat reserves for energy supply during pregnancy [18]. However, the rise in hormone levels, especially placental hormones, such as estrogen, progesterone, placental lactogen, and growth hormone, may influence the insulin resistance condition [3,19].

Evidence from animal models shows that blood glucose increase during pregnancy is compensated by pancreatic β -cell hypertrophy and hyperplasia, increasing insulin secretion and restoring glycemic control [4,20,21]. However, GDM could be associated with a reduced ability of the pancreas to carry out this compensatory response, leading to a hyperglycemic condition characterized by pancreatic β -cell dysfunction and an uninterrupted cycle of hyperglycemia and insulin resistance [4,22,23]. In addition, these metabolic dysfunctions occur before conception in cases of metabolic syndrome or type 1 diabetes mellitus, which, combined with the metabolic changes of pregnancy, trigger hyperglycemic conditions [23–25].

CONTACT Evandro Leite de Souza els@academico.ufpb.br Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Campus I – Jd., Cidade Universitária, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil

© 2024 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ANEXO

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



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v24/08/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 24/08/2024) da proposta intitulada "EFEITOS DO SIMBIÓTICO COMPOSTO PELO LIOFILIZADO DE CEPAS DE *L. FERMENTUM* (139, 263, 296) E CASCA DE JABUTICABA NO TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL EM RATAS WISTAR E SUAS REPERCUSSÕES NA SAÚDE CARDIOMETABÓLICA DA PROLE", CEUA nº 2218270124 (ID 065269), sob a responsabilidade de **José Luiz de Brito Alves e equipe; Deborah Emanuelle de Albuquerque Lemos** - 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 vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 12/09/2024.

Pedido apresentado à CEUA: Descrição: Após o nascimento dos filhotes, a intervenção com o simbiótico nas mães será cessado. Os filhotes serão pesados e medidos até o final do experimento. Para representar a prole dos grupos das ratas com diabetes gestacional, as ninhadas serão reduzidas de modo que sejam escolhidos aleatoriamente oito machos e oito fêmeas, formando a prole de cada grupo (CTL, DMGP e DMGSim). Aos 60 dias de vida será realizado o teste oral de tolerância à glicose, e após 72 horas o teste de tolerância à insulina. Quando atingirem 70 dias de vida, a prole será submetida à cirurgia de implantação de cateteres vasculares, no intuito de registrar a pressão arterial, frequência cardíaca a avaliar a função autonômica. Após isso, os ratos serão eutanasiados e os órgãos serão pesados. A eutanásia e o descarte de órgãos e carcaça desses animais serão realizados conforme descrito no tópico 5. Justificativa: É visto na literatura científica que a diabetes mellitus gestacional causa impactos não apenas na saúde materna como também na saúde do feto. Dentre as repercussões na saúde, tem-se a alteração do metabolismo da glicose e insulina que aumenta o risco do desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II e obesidade, além de aumentar os riscos de doenças cardiovasculares durante a vida adulta. Com isso, avaliar a repercussão da diabetes gestacional na prole e a efetividade do uso do simbiótico durante a gestação tornou-se um dos objetivos estimulantes para a inclusão de novos testes nesse projeto.

Considerações da CEUA: O pesquisador do projeto solicita a inclusão de novos testes na pesquisa, realizando análises experimentais na prole, onde justifica que a diabetes mellitus gestacional causa impacto também na saúde do feto. As mudanças da inclusão de novos testes foram adicionadas no projeto de pesquisa, tais como: mudança de título, alteração de resumo e objetivos, além da metodologia e resultados esperados. Entre as análises incluídas estão: parâmetros murinométricos na prole, teste oral de tolerância à insulina, cirurgia e registro da PA, avaliação da função autonômica e tons simpático e pesagem dos órgãos. O descarte das carcaças e órgãos da prole seguem conforme a Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, a Resolução CONAMA 358.29 de 2005 e a RDC 222 de 2018 da ANVISA. No delineamento experimental da prole o pesquisador incluiu como procedimentos metodológicos que após o nascimento dos filhotes, a intervenção com o simbiótico nas mães será cessado, e os filhotes serão pesados e medidos até o final do experimento. Para representar a prole dos grupos das ratas com diabetes gestacional, as ninhadas serão reduzidas de modo que sejam escolhidos aleatoriamente oito machos e oito fêmeas, formando a prole de cada grupo (CTL, DMGP e DMGSim). Aos 60 dias de vida será realizado o teste oral de tolerância à glicose, e após 72 horas o teste de tolerância à insulina. Quando atingirem 70 dias de vida, a prole será submetida à cirurgia de implantação de cateteres vasculares, no intuito de registrar a pressão arterial, frequência cardíaca a avaliar a função autonômica, e posteriormente os ratos serão eutanasiados e os órgãos serão pesados. O proponente atendeu todas as exigências desta CEUA, desta forma somos de parecer FAVORÁVEL a emenda do projeto. A Comissão.

Término previsto: 03/2025

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

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 30 a 50 dias

Quantidade
mantida: 0

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar

Peso: 50 a 60 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Fêmeas	69	0

João Pessoa, 26 de novembro de 2024

