

BARBARA COSTA PAULINO

**CONSEQUÊNCIAS DO USO DE SORO DE LEITE DE CABRA
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MORFOLOGIA
INTESTINAL E MICROBIOTA FECAL DE RATAS E
FILHOTES JOVENS ALIMENTADOS COM DIETA
OCIDENTALIZADA DESDE A VIDA PERINATAL**

RECIFE

2016

BARBARA COSTA PAULINO

**CONSEQUÊNCIAS DO USO DE SORO DE LEITE DE CABRA
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MORFOLOGIA
INTESTINAL E MICROBIOTA FECAL DE RATAS E
FILHOTES JOVENS ALIMENTADOS COM DIETA
OCIDENTALIZADA DESDE A VIDA PERINATAL**

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

Área de Concentração: Bases Experimentais da Nutrição

Orientador: Prof^a. Dra. Elizabeth do Nascimento

Co-orientador: Prof^a. Dra. Jailane de Souza Aquino

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P328c Paulino, Barbara Costa.
Consequências do uso de soro de leite de cabra sobre parâmetros bioquímicos, morfologia intestinal e microbiota fecal de ratas e filhotes jovens alimentados com dieta ocidentalizada desde a vida perinatal / Barbara Costa Paulino. – 2016.
77 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Elizabeth do Nascimento.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Soro de leite. 2. Microbiota intestinal. 3. Intestino delgado. 4. Ratos. I. Nascimento, Elizabeth do (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-224)

BARBARA COSTA PAULINO

**CONSEQUÊNCIAS DO USO DE SORO DE LEITE DE CABRA SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MORFOLOGIA E MICROBIOTA FECAL DE
RATAS E FILHOTES JOVENS ALIMENTADOS COM DIETA OCIDENTALIZADA
DESDE A VIDA PERINATAL**

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

Aprovada em 20 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profº. José Vitor Moreira Lima Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profª. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Eryvelton de Souza Franco
Faculdade IBGM

Dedico esse trabalho a todos os meus familiares que acreditaram e me deram força para alcançar esse sonho, em especial aos amores da minha vida: meus pais, Joana e Jorge, e meu noivo, Pedro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por ter permitido que eu chegassem até o fim dessa caminhada, fazendo com que eu superasse todos os obstáculos existentes durante esse período e por todas as vitórias concedidas. Certamente fui guiada por Ele e pela fé que tenho. Obrigada, Senhor!

Aos meus pais, **Joana e Jorge**, por toda paciência, incentivo, apoio, amor, dedicação, enfim, faltam palavras para definir tudo que vocês representam em minha vida e a importância que vocês tem nessa conquista. À vocês meu eterno agradecimento e amor!

Ao meu namorado, **Pedro**, pela paciência e dedicação ao me ajudar diariamente me acompanhando no laboratório, pelas palavras de incentivo, sempre confiando na minha capacidade, mesmo quando eu duvidava. Você me deu suporte quando tudo parecia estar dando errado, você me fez acreditar que esse sonho iria se tornar realidade. Te amo!

A minha tia **Solange** que possibilitou que eu realizasse essa caminhada. Nem com todas as palavras seria capaz de externar minha eterna gratidão.

A toda minha **família**, que sempre torce e vibra com minhas conquistas.

À minha orientadora, professora **Elizabeth do Nascimento**, com quem aprendi muito nesses dois anos. Muito obrigada por ter possibilitado a execução desse trabalho em outro estado, me orientando à distância, com todas as dificuldades que tive que enfrentar.

À minha co-orientadora, professora **Jailane Aquino**, pela paciência e ensinamentos.

Ao professor **Evandro Leite** pelos ensinamentos e acolhimento, e a todos do **Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos alimentos**, por toda disponibilidade que foi imprescindível para conclusão deste trabalho, em especial à **Nayara**, sempre paciente e disponível em ajudar.

Ao médico veterinário **Edeone França**, pelos ensinamentos sobre o cuidado com os animais.

Aos queridos estagiários do **LANEX** da UFPB, em especial, às queridas **Jéssyca, Priscilla e Laiane**, com quem aprendi muito. Obrigada pela dedicação e competência de vocês.

Às minhas queridas conterrâneas, **Larissa e Neusa**, companheiras de estrada, de quarto, de vida! Meninas, obrigada pela paciência nos momentos de desespero, obrigada pelo incentivo, vocês fizeram toda a diferença para mim nesse mestrado!

À amiga que o mestrado me deu, **Stella**, obrigada pelas horas de incentivo e de paciência, sua amizade foi um presente!

À **Thamires Sena**, muito obrigada pelos ensinamentos e horas dedicadas às análises morfológicas.

À Professora **Claudenice Rodrigues do Nascimento**, coordenadora do Laboratório de Processamento de Materiais Biológicos da ETS-UFPB, por ter disponibilizado o laboratório para execução das análises morfológicas.

À **Lydiane** pela disponibilidade em ajudar nas análises bioquímicas.

Aos **professores da Pós-graduação** em nutrição da UFPE, por todos os ensinamentos.

As secretárias **Neci e Cecília**, por toda atenção.

“Tudo que pedirdes com fé em oração, vós o alcançareis”
(Mateus 21, 22)

RESUMO

A dieta ocidentalizada, rica em lipídeos, açúcar, sódio e alimentos processados e ultra processados tem sido apontada como um dos mais relevantes fatores associados ao excesso de peso/obesidade, comorbidades e distúrbios fisiometabólicos observados em estudos epidemiológicos e experimentais em animais. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do soro de leite de cabra sobre o estado nutricional, microbiota, histologia intestinal e parâmetros bioquímicos de ratas e filhotes alimentados com dieta ocidentalizada. Foram utilizados 8 machos e 24 fêmeas da linhagem *Wistar* (da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco) para o acasalamento dos animais. Ratas gestantes foram divididas em quatro grupos experimentais de acordo com a dieta: Controle ou Ocidentalizada e a suplementação ou não com soro de leite de cabra. Evolução ponderal e consumo alimentar das ratas seguiram por todo experimento. Ao desmame, as ratas e metade da prole de machos de cada ninhada foram eutanasiados para análise dos parâmetros bioquímicos, histologia intestinal, micro-organismos fecais. Metade dos filhotes foi submetida aos mesmos acompanhamentos e eutanasiados aos 45 dias de vida. A suplementação com soro de leite de cabra modificou poucos parâmetros nas ratas com exceção da alteração da quantidade de lactobacilos totais, que nos grupos controles com solução salina apresentaram uma média de $7,34 \pm 0,08$ log.UFC/g⁻¹ e $6,43 \pm 0,31$ log.UFC/g⁻¹ e no suplementado $7,79 \pm 0,30$ log.UFC/g⁻¹ e $6,94 \pm 0,45$ log.UFC/g⁻¹ para ratas com dieta ocidentalizada e padrão, respectivamente. Nos filhotes, a suplementação com soro de leite de cabra promoveu redução no ganho de peso e dos depósitos de gordura abdominal, alteração bioquímica, aumentou em 15% a contagem de lactobacilos e em 13% as enterobactérias. Além disso, minimizou o desgaste de células intestinais, limitando o processo inflamatório observado nos alimentados com dieta ocidentalizada. Dessa forma, pode-se sugerir que o soro de leite teve potencial efeito na microbiota fecal e morfologia intestinal, e que esses efeitos parecem depender da idade e do período de suplementação.

Palavras chaves: Soro de leite. Microbiota Intestinal. Intestino delgado. Ratos.

ABSTRACT

The westernized diet rich in fat, sugar, sodium and processed foods and processed ultra has been identified as one of the most important factors associated with overweight / obesity, comorbidities, and physiological and metabolic disorders observed in epidemiological and experimental studies in animals. The aim of this study was to investigate the effects of serum of goat milk on the nutritional status, microbiota, intestinal histology and biochemical parameters of rats and offspring fed westernized diet. Were used 8 male and 24 female Wistar (the colony of the Department of Nutrition at the Federal University of Pernambuco) for mating of animals. Pregnant rats were divided into four groups according to the diet: control or Westernized and supplemented or not with serum from goat milk. weight gain and food consumption of rats followed throughout the experiment. At weaning, rats, half male offspring in each litter were sacrificed for analysis of biochemical parameters, intestinal histology, faecal micro-organisms. Half of the pups was subjected to the same accompaniments and euthanized at 45 days of life. Supplementation with goat whey modified few parameters in rats with the exception of changing the amount of total lactobacilli that in control groups with saline had a mean of $7,34 \pm 0,08 \log.\text{UFC/g}^{-1}$ and $6,43 \pm 0,31 \log.\text{UFC/g}^{-1}$ and supplemented $7,79 \pm 0,30 \log.\text{UFC/g}^{-1}$ and $6,94 \pm 0,45 \log.\text{UFC/g}^{-1}$ to rats with westernized diet and standard, respectively. In puppies, supplementation with goat whey promoted reduction of 200% in weight gain and deposits of abdominal fat, biochemical change, increased by 15% to lactobacillus count and 13% enterobacteria. In addition, minimized wear of intestinal cells by limiting the inflammatory process observed in fed westernized diet. Thus, it can be suggested that the whey had potential effect on fecal microbiota and intestinal morphology, and that these effects appear to depend on the age and supplementation period.

Key words: Whey. Microbiota fecal. Small intestine. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da Variância
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
NRC	<i>National Research Council</i>
PEG	Polietilenoglicol
TGI	Trato Gastrointestinal
TLR	<i>Tool-like</i> Receptores
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VET	Valor Energético Total
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

Grupos experimentais

CSAL	Dieta Controle e gavagem com solução salina
CSORO	Dieta Controle Suplementado com Soro do Leite de Cabra
OSAL	Dieta Ocidentalizada e gavagem com solução salina
OSORO	Dieta Ocidentalizada Suplementado com Soro do Leite de Cabra

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma com a randomização dos animais nos grupos experimentais.....	28
Figura 2 – Variação de peso corporal de ratas dos grupos que consumiram dieta controle ou dieta ocidentalizada durante o período gestacional (A) e lactacional (B).	33
Figura 3 – Evolução ponderal de filhotes durante a lactação (3A) e após o desmame (3C), percentual de ganho de peso na lactação (3B) e após o desmame (3D) segundo manipulação dietética e suplemento de soro de leite de cabra.....	34
Figura 4 – Influência da dieta materna e da suplementação com soro de leite de cabra sobre a ingestão alimentar de ratas durante as semanas de gestação (A) e de lactação (B) e sobre o valor energético durante a gestação (C) e lactação (D).	35
Figura 5 – Médias das populações de micro-organismos nas amostras de fezes cultivados em aerobiose (Bactérias aeróbias) e anaerobiose (<i>Lactobacillus</i> , Bifidobactérias e Anaeróbios), de ratas (A) e de filhotes (B) alimentados com dieta controle ou ocidentalizada e tratados com solução salina ou soro de leite de cabra..	40
Figura 6 – Histologia do jejuno de ratas (A), filhotes aos 23 dias (B) e filhotes aos 45 (C) dias. Imagem de microscopia com aumento de 100x.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização físico-química do soro do leite de cabra liofilizado utilizado no experimento.....	25
Tabela 2 - Composição química e energética das dietas controle e ocidentalizada usadas nos experimentos.....	26
Tabela 3 - Parâmetros murinométricos e peso relativo dos órgãos de ratas, filhotes da 1 ^a etapa de experimento e 2 ^a etapa de experimento.....	37
Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de ratas, filhotes da 1 ^a etapa e 2 ^a etapa do experimento.	38

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1. DIETA OCIDENTALIZADA: IMPACTOS À SAUDE	17
3.2. MICROBIOTA INTESTINAL E FECAL	19
3.3. SORO DO LEITE DE CABRA E EFEITOS PREBIÓTICOS	21
4. MÉTODOS.....	24
4.1. SORO DO LEITE DE CABRA.....	24
4.1.1. Obtenção do Soro do Leite de Cabra.....	24
4.1.2 Liofilização do soro do leite de cabra	24
4.1.3. Análises Físico-Químicas.....	25
4.1.4. Análise microbiológica do soro	25
4.2. ANIMAIS E DIETA	25
4.3. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	28
4.4. DETERMINAÇÕES PONDERAIS.....	28
4.4.1. Determinação do Peso Corporal	28
4.4.2. Avaliação Murinométrica e Determinação do Estado Nutricional.....	29
4.5. EUTANÁSIA.....	29
4.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	29
4.7. ANÁLISE DOS TECIDOS	30
4.7.1. Determinações morfológicas do intestino	30
4.8. ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL	31
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE A	55
ANEXO A	76
ANEXO B	776

1. APRESENTAÇÃO

A ingestão de alimentos contendo carboidratos complexos e elevados teores de fibras, predominante em países agrícolas, tem sido reduzida em detrimento do aumento da ingestão de alimentos com maior teor de aditivos, gorduras totais (sobretudo de ácidos graxos saturados e gorduras “trans”), bem como, de carboidratos simples de alto índice glicêmico. Este padrão de alimentação tem sido caracterizado como “dieta ocidentalizada”, ou “*American diet*” e apontado como um dos mais relevantes fatores associados ao excesso de peso/obesidade e comorbidades em seres humanos (POPKIN, 2001), assim como diversos distúrbios fisiometabólicos observados em estudos experimentais em animais (CAVALCANTE et al., 2013; FORBES et al., 2013; DEMIGNÉ et al., 2006).

Ao longo da vida, existem períodos mais vulneráveis a essas influências ambientais, sendo o período de gestação, lactação e primeira infância, destaque nas pesquisas científicas devido a sua repercussão em curto, médio e longo prazo sobre o desenvolvimento do organismo e o processo saúde-doença (POWER; SCHULKIN, 2013). Deficiências ou excessos nutricionais no início da vida têm sido associados a diversas doenças como a obesidade e surgimento de um estado inflamatório no organismo, a exemplo da redução da atividade do sistema imunológico (PISABARRO et al., 2004).

O sistema imunológico é um sistema complexo que, na criança, não se encontra completamente maturado antes dos 5-6 anos de vida. Dentre os fatores relevantes para o desenvolvimento do sistema imune encontra-se a colonização do trato gastrointestinal (TGI) pela microbiota intestinal (RUMBO; SHINFRIN, 2005). A colonização do TGI estéril do feto inicia-se imediatamente após o parto, e, esta microbiota diversificada possui importante papel para a maturação local e sistêmica da imunidade, expressão de diversos genes do TGI, a exemplo dos relacionados com a defesa do organismo, atividade das células intestinais, incluindo digestão, síntese de vitaminas, absorção de nutrientes e compostos bioativos (CHIOU et al., 2013; COLLADO et al., 2012; PALMER et al., 2007).

Depois de formada, a microbiota intestinal humana é composta, principalmente, por três filos: Bacteroidetes (*Bacteroides* e *Prevotella*), Firmicutes (*Ruminococcus* e *Eubacterium*) e Proteobacteria, sendo os principais enterotipos presentes na flora intestinal compostos por *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*, com maior predominância das do filo Bacteroidetes, seguidos do filo Firmicutes (DORÉ et al., 2013; RAMAKRISHNA, 2013).

A atividade da microbiota intestinal é influenciada tanto por meio da administração de probióticos, que são micro-organismos vivos, cuja ingestão em quantidades adequadas é

benéfica à saúde (BUTEL, 2014), quanto por compostos não digeríveis pelo TGI (prebióticos). Os prebióticos são totalmente ou parcialmente metabolizados pela microbiota no intestino grosso, estimulando o crescimento e atividade de bactérias, tais como os lactobacilos e as bifidobactérias (QUIGLEY, 2012). Dentre os compostos com esta capacidade destacam-se as fibras dietéticas solúveis, com inclusão do amido resistente e de oligossacarídeos.

O leite de cabra é considerado um leite de boa qualidade e de propriedades nutricionais por vezes superiores ao de vaca. Além disso, apresenta uma grande quantidade de oligossacarídeos (DADDAOUA et al., 2006). Um estudo realizado por Sprong, Schonewille, e Van-Der (2010) observou que apesar dos animais se alimentarem com uma dieta ocidentalizada, a inclusão de proteína do soro do leite aumentou a quantidade de lactobacilos e bifidobactérias fecais.

Frente ao sucinto leque de evidências, parecem existir maneiras de atenuar os efeitos negativos da dieta “ocidentalizada” ou hiperlipídica sobre alterações metabólicas a partir da microbiota intestinal e, por conseguinte, do risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao metabolismo. Diante do exposto, parece que a intervenção dietética ou de componentes alimentares com aspecto funcional tem se mostrado relevante. Ademais, estudos que impulsionem o aproveitamento do soro de leite tornam-se importante, tendo em vista que este produto é um resíduo proveniente da indústria do processamento de queijos e necessita de um destino sustentável na cadeia produtiva (SANTMARTÍN; DIAZ; TURIENZO, 2012).

Dessa forma, a pergunta que conduziu o trabalho foi: a suplementação do soro do leite modifica a microbiota fecal de ratas e filhotes alimentados com dieta ocidentalizada? A partir desta pergunta chave e das evidências citadas anteriormente, hipotetizou-se que a suplementação do soro do leite de cabra irá minimizar os efeitos causados pela dieta ocidentalizada na microbiota fecal de ratas e filhotes.

Portanto, o estudo se propôs a investigar os efeitos do soro de leite de cabra sobre a microbiota, estado nutricional, histologia intestinal e parâmetros bioquímicos de ratas e filhotes alimentados com dieta ocidentalizada. A partir da hipótese que a suplementação com soro de leite de cabra é benéfica ao organismo, supõe-se que os resultados obtidos possam propiciar um fator benéfico à saúde do indivíduo, com agregação de valor ao produto, ampliando seu consumo e mercado. Igualmente pode fortalecer a economia local e, possivelmente, em nível Nacional e Internacional, a partir de informações oriundas de pesquisa científica com vistas ao desenvolvimento, inovação e ações sobre a saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação do soro do leite de cabra liofilizado sobre o estado nutricional, consumo alimentar, microbiota e morfologia intestinal de mães e filhotes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal do soro de leite de cabra
- Acompanhar a evolução ponderal e consumo alimentar durante o período de experimentação;
- Quantificar a glicemia, os lipídios séricos e enzimas hepáticas de mães e filhotes;
- Avaliar o peso do tecido hepático, intestinal e o adiposo visceral;
- Analisar a morfologia intestinal dos animais;
- Identificar a presença de algumas cepas de bactérias nas amostras de fezes de mães e filhotes;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DIETA OCIDENTALIZADA: IMPACTOS À SAÚDE

No início do século passado, a participação da nutrição não era o foco nas pesquisas com ênfase nos fatores predisponentes da obesidade. No entanto, com o passar dos anos, foi-se observando diversas mudanças no estilo de vida. Dentre essas se destacam o padrão alimentar e a prática de atividade física culminando com a redução da qualidade das dietas e da prática de exercícios. Neste contexto destaca-se o aumento no consumo de alimentos processados/ultraprocessados e *fast-foods*, propiciando um aumento da gordura corporal, repercutindo na elevação do sobrepeso e obesidade, com ressalvas ao incremento de sua prevalência nas últimas décadas (POPKIN; ADAIR; WEN, 2012). As consistentes mudanças no padrão alimentar e comportamentais trazem como consequência incremento na prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, redução da desnutrição e aumento do sobrepeso/obesidade caracterizando o quadro de transição nutricional (VORSTER; KRUGER; MARGETTS, 2011).

Os países em desenvolvimento têm vivenciado o processo de transição nutricional e epidemiológica como resultantes das mudanças no estilo de vida, caracterizados principalmente por uma redução da atividade física e aumento do consumo de alimentos industrializados com elevado teor calórico em detrimento da ingestão de produtos de natureza mais agrícola (COHEN et al., 2013). As alterações nos hábitos alimentares como o aumento da densidade energética, proveniente de um elevado teor de gordura total e de ácidos graxos saturados, bem como de açúcares, com concomitante redução no teor de fibras, e, aumento de alimentos processados, caracteriza o padrão ocidental de alimentação conhecida como dieta ocidentalizada (ASTRUP, 2007). Em longo prazo, essa dieta predispõe o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e esteatose hepática em ratos adultos e seres humanos e nos processos de recompensa alimentar, além de alterações na microbiota intestinal (ETXEBERRIA et al., 2015).

Diversas alterações na microbiota tem sido influenciada por uma dieta com maior quantidade de gordura saturada e carboidratos simples. A longo prazo, especialmente em indivíduos obesos, essa dieta promove um aumento nas bactérias do filo Firmicutes, consideradas prejudiciais à saúde, e uma redução do filo Bacteroidetes consideradas bactérias benéficas à saúde (KOTZAMPASSI; GIAMARELOS-BOURBOULIS; STAVROU, 2014). Outro estudo, utilizando dois tipos de dieta (rica em fibras e pobre em gorduras; pobre em fibras e rica em gorduras), demonstrou que a composição da dieta afeta a microbiota intestinal

em longo prazo, a exemplo do maior número do filo Bacteroidetes, sobretudo quando estas possuem abundância em proteína animal e gorduras saturadas. Contudo, quando uma dieta rica em fibras e baixa em gordura foi utilizada em curto prazo (dez dias) não foram observadas mudanças significativas, no enterotipo *Prevotella*, sugerindo que os enterotipos refletem mais os hábitos alimentares em longo prazo (WU et al., 2011).

Modelos animais de obesidade a partir de dietas com desequilíbrios nutricionais (maior quantidade de gordura saturada) promovem aumento do filo Firmicutes e redução do Bacteroidetes (LEY et al., 2005). Em humanos obesos demonstrou-se que além do aumento dos Firmicutes, ocorre incremento do filo Actinobacterium e redução do filo Bacteroidetes (TURNBAUGH et al., 2009). Essas alterações nas proporções de bactérias que habitam o trato intestinal são de suma importância devido aos inúmeros estudos que a associam a um estado vulnerável à instalação da obesidade outras doenças de natureza inflamatória e metabólica (CLEMENTE et al., 2012). Além de mudanças na microbiota, a dieta ocidentalizada também tem sido associada ao desenvolvimento de esteatose hepática (ISHIMOTO et al., 2013) que pode incrementar o processo inflamatório no organismo.

Outro modelo dietético observou que os efeitos relativos ao acúmulo de energia corporal mostraram-se semelhantes quando se utiliza dieta elevada em gordura e dieta com suplementação de frutose associada a uma dieta rica em gordura. Contudo, o mesmo não procedeu para o acúmulo de gordura hepática e perfil lipídico, cujas consequências adversas foram mais acentuadas na dieta que associou frutose e gordura (CRESCENZO et al., 2008).

O uso de dieta estilo ocidental antes e durante a gestação e lactação, não alterou a glicemia de jejum, mas, promoveu aumento na gordura corporal e aumento dos níveis de insulina (SEN; SIMMONS, 2010). Recente estudo que utilizou dieta “ocidentalizada” apenas na gestação e lactação, demonstrou na prole adulta, hiperglycemia, maior quantidade de gordura visceral, hiperinsulinemia e elevados valores de triglicerídeos e VLDL-c, e, reduzido HDL-c (CAVALCANTE et al., 2014). O aumento do teor de gordura no leite materno também parece causar relevantes mudanças na microbiota intestinal da prole com aumento das populações de *Enterococcus* e *Lactobacillus* e redução de *Bacteroides* e *Prevotella* (MOZES et al., 2008).

As consequências da dieta ocidentalizada ingerida na vida perinatal sobre o estado de saúde da prole, parecem se estender em curto (a exemplo de alterações na microbiota) e em longo prazo, a desordens do metabolismo favorecendo a instalação de síndrome metabólica (PRUIS et al., 2013).

3.2. MICROBIOTA INTESTINAL E FECAL

A colonização do trato gastrointestinal por bactérias se inicia logo após o nascimento quando ocorre uma exposição à microflora intestinal e ao contato com a pele da mãe (TORMO-BADIA et al., 2014). Estudos como o de Grönlund et al. (2011), que avaliaram a influência da microbiota intestinal materna na colonização intestinal na infância, observaram que um mês após o nascimento, havia uma correlação na contagem do gênero *Bifidobacterium* em mães e em seus filhos. Estes relatos sugerem a importância da associação entre a microbiota intestinal das mães e dos filhos durante a primeira infância.

O intestino fetal é estéril e a colonização dos micro-organismos ocorre após o parto, por meio da mãe, e pelo contato do recém-nascido com o ambiente. Portanto, acredita-se que os micro-organismos podem ser importantes para seu desenvolvimento da prole (KARLSSON et al., 2011). O trato gastrointestinal (TGI) humano possui aproximadamente 500-1000 espécies diferentes de micro-organismos, apresentando diferenças entre os indivíduos a depender de fatores internos como genética, saúde e idade e externos a exemplo da dieta (COLLADO et al., 2012). O papel do TGI na saúde do hospedeiro tem sido discutido com mais domínio nas últimas décadas. Alguns estudos apontam que uma vez formada a microbiota, esta permanece inalterada ao longo da vida, podendo apenas realizar mudanças transitórias (BROWN et al., 2012).

A formação da microbiota intestinal é influenciada por diversos fatores, como a microbiota materna, o meio-ambiente e a alimentação. Ao atingir a vida adulta esta já terá completado a sua formação. Os três filos predominantes na microbiota de adultos saudáveis compreendem 75% dos micro-organismos do TGI: os *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* (COLLADO et al., 2012; MARIAT et al., 2009).

Seguindo a hierarquia de prevalência, as bactérias anaeróbias são dominantes ($>10^9$ Unidades Formadoras de Colônias - UFC), representadas pelos gêneros *Bacteroidetes*, *Eubacterium* e *Bifidobacterium*, e subdominantes ($<10^9$ UFC), bactérias da família Enterobacteriaceae, tais como *E. coli*, e os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Fusobacterium* (MARIAT et al., 2009).

Estudos como o de Vaishampayan et al. (2010) mostram que a composição da microbiota é variável no início da vida. Os resultados revelaram que *Escherichia* e *Bacteroides* são os mais abundantes no primeiro mês de vida; já os *Bifidobacterium* só iniciaram o desenvolvimento após o primeiro mês, seguindo até o décimo primeiro mês. Porém, os resultados deste estudo devem ser interpretados com cautela visto que a mãe

utilizou antibióticos dias antes do parto. Assim, foi possível observar que houve um aumento no *Bifidobacterium* e uma redução nos *Bacteroidetes*. Alterações na microbiota causadas pelo uso de antibióticos também foram observadas no estudo de Savino et al. (2011). Após cinco dias da administração de um antibiótico observou-se em análises microbiológicas redução na contagem total de bactérias, especialmente, uma redução significativa de *Enterobacteriaceae*, *Enterococos* e *Lactobacilos*, quando comparado ao grupo controle.

Outro fator que pode atuar na alteração da microbiota intestinal no início da vida é a alimentação da criança. Crianças alimentadas exclusivamente com leite materno apresentam modificações na microbiota intestinal quando comparadas a crianças alimentadas com fórmula infantil. As alimentadas com fórmulas possuem maiores proporções de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, Enterobactérias e *Veillonella* spp., enquanto as amamentadas apresentam maior proporção de Bifidobactérias e *Lactobacillus* (ARRIETA et al., 2014). O estado nutricional do indivíduo também influencia na composição da microbiota intestinal. Estudos com indivíduos magros e obesos verificaram respectivamente, menor proporção de *Bacteroides*, e, maior proporção de Acinetobactérias (TURNBAUGH et al., 2009).

Doenças metabólicas, como a síndrome metabólica e o diabetes tipo II, também têm sido relacionadas com alterações na microbiota intestinal, bem como no processo inflamatório (KAHN; FLIER, 2000; WELLEN et al., 2005). Em geral, os resultados observados em estudos envolvendo indivíduos diabéticos comparados aos indivíduos saudáveis, mostram que a proporção de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* é um pouco mais elevada, e que os *Firmicutes* são significativamente menores nos indivíduos diabéticos (LARSEN et al., 2010).

Mozaffarian et al. (2011) observaram que a microbiota intestinal alterada ou disbiose (desequilíbrio da microbiota intestinal) possui fortes associações com o ganho de peso e a obesidade. Camundongos alimentados com dieta com baixo teor de gordura, a base de polissacarídeos vegetais, quando permitem esta ração por uma dieta estilo “Ocidental” modificam a microbiota exibindo altos níveis de *Clostridium innocuum*, *Eubacterium dolichum*, *Catenibacterium mitsuokai* e *Enterococcus* spp concomitante com a redução de *Bacteroides* spp. (TURNBAUGH et al., 2009).

Apesar de alguns fatores contribuírem para a composição da microbiota, a dieta configura como um dos de maior impacto. Os fatores dietéticos como a proporção de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos) podem alterar o tempo de trânsito intestinal e o pH afetando de forma significativa a microbiota intestinal (SCOTT et al., 2013).

Em mamíferos, alguns componentes dietéticos não conseguem ser digeridos no intestino delgado, devido à ausência de enzimas hidrolíticas específicas e chegam intactos ao

intestino grosso. Entre esses componentes destacam-se fibras dietéticas (celulose e pectina, por exemplo), oligossacarídeos e o amido resistente. São esses resíduos não digeríveis que atuam fornecendo a principal fonte energética para o crescimento dos micro-organismos no cólon (FLINT, 2012).

A depender da ingestão de carboidratos, (a exemplo das fibras e do tipo de amido), diferentes composições da microbiota intestinal podem ocorrer. Estudo com crianças mostrou que aquelas alimentadas com maior quantidade de fibras apresentaram maior proporção de *Bacteroidetes*, principalmente, *Prevotella*. Por outro lado, as crianças cuja alimentação era rica em amido apresentaram maior proporção de *Firmicutes* (DE FILIPPO et al., 2010).

A ingestão elevada de gorduras também tem sido relacionada com alterações no padrão da microbiota intestinal em ratos. A elevada ingestão de gordura em ratos durante o aleitamento promoveu alterações funcionais e na microbiota intestinal, bem como, aumento da gordura corporal. Filhotes alimentados com leite rico em gordura apresentaram redução no número de *Bacteroides* e *Prevotella* e aumento no número de *Lactobacillus* e *Enterococcus* (MOZES et al., 2008).

Em suma, é possível observar que a colonização da microbiota intestinal é influenciada por diversos fatores e que a composição da microbiota é influenciada por diversos fatores com destaque para a composição nutricional e/ou distribuição e tipo de macronutrientes na dieta ingerida (JEFFERY; O'TOOLE, 2013). Estas precoces alterações na microbiota parecem ter consequências em longo prazo sobre o metabolismo, configurando assim o início da vida como uma janela crítica para a interação da microbiota do hospedeiro com o metabolismo (COX et al., 2014).

3.3. SORO DO LEITE DE CABRA E EFEITOS PREBIÓTICOS

A criação de cabras é uma atividade econômica em expansão que assume particular relevância para o clima semiárido do Nordeste. Uma pesquisa realizada pela Embrapa Caprinos e Ovinos demonstrou que, entre os consumidores de leite de cabra, a principal motivação (33,3%) para a sua escolha de consumo foi o reconhecimento do alto valor nutritivo e associação com saúde (BOMFIM et al., 2011). Ademais, o leite de cabra possui um potencial alergênico menor e uma digestibilidade maior (HAENLEIN, 2004). Esta condição pode representar uma via factível de incremento do seu consumo pela população.

O soro de leite, obtido por meio da fabricação de queijos, embora seja descartado pelos produtores por considerá-lo um produto residual, é um produto valioso do ponto de vista nutricional, uma vez que este é rico em proteínas, carboidratos (lactose e oligossacarídeos), minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTMARTÍN; DIAZ; TURIENZO, 2012).

A realização de estudos sobre as propriedades funcionais do soro advindas do leite caprino o expõe a um mercado em potencial. Observações como estas, somadas à crescente busca dos consumidores por alimentos relacionados à promoção de saúde, vem a impulsionar a necessidade de pesquisas com enfoque na avaliação das propriedades bioativas dos componentes presentes não apenas no leite de cabra, mas, em seus produtos derivados (BOMFIM et al., 2011).

Os componentes do leite foram reconhecidos como alimentos funcionais na década de 1980 por pesquisadores japoneses (OLIVEIRA et al., 2012). Os alimentos funcionais são aqueles que contêm componentes biologicamente ativos e que, além de fornecer energia e atuar na manutenção dos processos vitais de reparação, conferem benefícios específicos à saúde humana (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2009).

Alguns estudos tem sugerido que o leite humano está associado com funções anti-inflamatórias, por meio da produção de mediadores anti-inflamatórios, anti-viral e de imunomodulação. A ingestão dos componentes do leite *in natura* por suas espécies promovem o crescimento das bifidobactérias, auxiliando assim, a melhoria da saúde intestinal (BOEHM; STAHL, 2007; BHAT, Z.; BHAT, H., 2011). Bifidobactérias são espécies que naturalmente participam das funções da microbiota intestinal e relatos recentes indicam que a dieta é um dos fatores mais factíveis de intervir na melhora do perfil da microbiota (BOEHM; STAHL, 2007). No caso da alimentação, as maiores estratégias para melhoria da microbiota intestinal têm sido focadas no uso de probióticos e prebióticos.

Os probióticos são microrganismos que, ingeridos em quantidades adequadas, podem auxiliar na saúde do hospedeiro, enquanto os prebióticos são compostos não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, seletivamente fermentados no intestino grosso, que promovem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota, estimulando seu crescimento e atividade no intestino, conferindo benefícios à saúde ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002; GIBSON et al., 2004; QUIGLEY, 2012). Quando o mesmo composto possui interação *in vivo* da atividade probiótica e prebiótica simultaneamente e atuando sinergicamente, recebe a denominação de simbiótico (MUGAMBI et al., 2012). O leite

materno possui claras evidências desta condição de atuar como um composto simbiótico (ABRAHAMSSON et al., 2009; MARTÍN et al., 2005)

Os oligossacarídeos do leite materno são considerados prebióticos e estimulam o crescimento de bifidobactérias. Além disso, os oligossacarídeos do leite humano são associados a um mecanismo de defesa do organismo, tendo em vista que possui estrutura semelhante à encontrada em células intestinais (DADDAOUA et al., 2006).

O leite de cabra, embora possua uma quantidade inferior de oligossacarídeos quando comparado ao leite materno humano, apresenta quantidade superior de oligossacarídeos em relação ao leite bovino e ovino (DADDAOUA et al., 2006; MARTINEZ-FEREZ et al., 2006). Os oligossacarídeos presentes no leite de cabra, por exemplo, foram associados à melhoria da síndrome do intestino irritável, por serem prebióticos com potencial efeito anti-inflamatório (DADDAOUA et al., 2006).

Apesar das evidências do potencial benéfico do soro de leite, seu potencial como modulador do microbioma e relações com futuras doenças ainda é um tema que necessita ser mais bem investigado, sobretudo se derivado do leite de cabra.

4. MÉTODOS

4.1. SORO DO LEITE DE CABRA

4.1.1. Obtenção do Soro do Leite de Cabra

O leite de cabra utilizado no experimento foi obtido do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus de Bananeiras - PB, Brasil. O plantel do setor dispõe de um total de 150 cabras alpinas, das quais foram selecionados os animais com 40 ± 6 kg de peso vivo e 30 ± 5 dias de lactação. Os animais foram mantidos em sistema intensivo alocados em galpão coberto, onde receberam ração completa (a base de milho, soja, algodão e trigo) composta de concentrado, feno de tifton e palma forrageira. As dietas consumidas pelos caprinos foram calculadas segundo *National Research Council* (NRC, 2007) para satisfazer as exigências de produção de leite de 1,5 kg/dia, com 4% de gordura. As amostras de leite foram coletadas em cinco dias consecutivos, através de ordenha manual. Foram obtidas amostras de leite caprino pela manhã e tarde para cada animal, constituindo amostras compostas, proporcional à produção de leite para cada turno de ordenha, que foram acondicionadas em garrafas de polietileno de 500 mL.

A partir do processamento deste leite foi obtido o soro tipo doce, garantindo o controle de sua origem como resíduo da fabricação de queijos de coalho. Após coleta, aproximadamente 7L de soro foram inicialmente desnatados e filtrados em tripla camada de gaze para remoção de contaminantes grosseiros. Em seguida, foram congelados a -22°C até o momento da liofilização (SANTMARTÍN; DIAZ; TURIENZO, 2012).

4.1.2 Liofilização do soro do leite de cabra

As amostras do soro do leite de cabra congeladas a -22°C em freezer foram liofilizadas sob pressão de vácuo de 69 μ Hg e temperatura de -47°C em Liofilizador L101 Liotop® (São Carlos – SP, Brasil) durante 24h. O processo de liofilização consiste na retirada total da água do leite por sublimação. Após o processo de secagem, as amostras foram armazenadas em freezer a -22°C em recipientes de vidro protegidos da luz (SANTMARTÍN; DIAZ; TURIENZO, 2012).

4.1.3. Análises Físico-Químicas

Após o processo de liofilização foram realizadas as análises do soro, no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição, no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As amostras foram analisadas em triplicata, quanto ao percentual de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e lactose, seguindo a metodologia recomendada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2010), conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do soro do leite de cabra liofilizado utilizado no experimento.

Parâmetros	Média ± SD
Proteína (%)	15,78 ± 0,52
Carboidratos (%)	
Lactose (%)	9,95 ± 0,37
Outros	N.d
Lipídio (%)	11,40 ± 0,74
Umidade (%)	4,14 ± 0,02
Cinzas	6,88±0,70
Valor energético – VET (Kcal)	205,52

4.1.4. Análise microbiológica do soro

O soro liofilizado foi submetido à análise microbiológica quanto aos Coliformes totais e fecais, Estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, para garantir a ausência de contaminantes (BRASIL, 2001). Também foram realizadas análises quanto aos *Lactobacillus*, Bacteroides, *Bifidobacterium* e Enterobactérias. Todos os micro-organismos investigados mostraram-se ausentes.

4.2. ANIMAIS E DIETA

Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram realizados somente após análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da UFPE sob processo nº 23076.044893/2014-21 (ANEXO A).

Foram utilizados 8 machos e 24 fêmeas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Realizou-se o acasalamento dos animais na proporção de 1 macho: 3 fêmeas, para isto, foram utilizadas fêmeas com peso corporal entre 220-240g.

Após o acasalamento, a prenhez foi detectada a partir da presença de espermatozoide no esfregaço vaginal e acompanhamento do ganho de peso corporal. Ao detectar o início da gestação, as ratas foram mantidas, durante o período gestacional, em gaiolas individuais e transparentes para evitar o isolamento. Neste momento, as ratas foram randomizadas em quatro grupos experimentais, com n=6 ratas por grupo, assim distribuídas:

- Grupo Dieta Controle e gavagem com Solução Salina (CSAL);
- Grupo Dieta Ocidentalizada e gavagem com Solução Salina (OSAL);
- Grupo Dieta Controle e Suplementação com soro do leite de cabra (CSORO) e
- Grupo Dieta Ocidentalizada e Suplementação com soro do leite de cabra (OSORO).

Os grupos de animais foram alimentados *ad libitum* com dieta para crescimento à base de caseína como fonte proteica (AIN-93G) nos grupos com dieta controle (REEVES et al., 1993) ou dieta ocidentalizada (grupos com dieta experimental) contendo caseína, maior teor de gordura, açúcar e sódio e reduzida quantidade de fibras (CAVALCANTE et al., 2013) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição química e energética das dietas controle e ocidentalizada usadas nos experimentos.

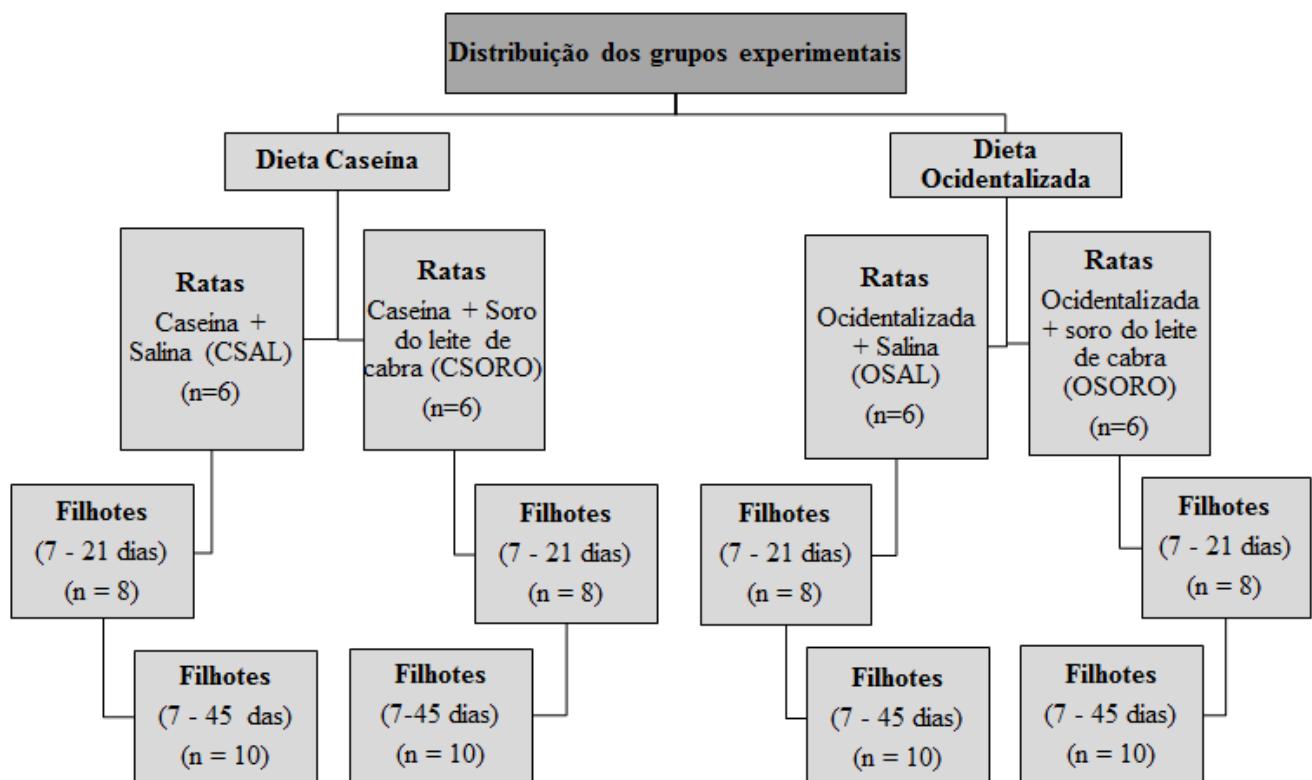
Composição química	Dieta controle	Dieta ocidentalizada
Proteína g/100g	17,0	22,0
Carboidrato (g/100g), dos quais:	58,9	49,6
Carboidrato simples	10,0	23,0
Carboidrato complexo	47,0	22,0
Fibras	5,0	4,6
Lipídio	7,2	19,0
Umidade e substâncias voláteis (g/100g)	9,5	4,2
Cinzas (g/100g)	6,0	5,22
Energia total (cal/g)	3,6	4,1
%kcal VET		
Proteína	19,0	21,0
Carboidrato	63,0	42,0
Lipídio	18,0	37,0

Fonte: Laboratório de Análise de Alimentos LEAAL/Departamento de Nutrição-UFPE e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos- TACO, 4^a ed.

O soro de leite de cabra foi utilizado como suplementação para os animais formando os grupos CSORO e OSORO. Para isto, foi realizada a diluição do soro de leite de cabra liofilizado (1g/Kg de peso do animal) em solução salina (volume de 0,1g/mL) (AFUWAPE; TURNER; STROBEL, 2004; PESSI et al., 1998) e administrado por meio de gavagem, a partir do dia de detecção da prenhez. Da mesma forma, foi realizada a gavagem nos grupos CSAL e OSAL com solução salina (0,9%), no volume de 10mL/Kg de peso corporal do animal.

Ao nascimento dos filhotes, foram determinados: o peso das ninhadas, o número de filhotes por cria e o sexo mediante a diferenciação da distância genito-anal, onde para machos a distância ano-genital é maior que das para fêmeas, (em torno de 2,5mm). Durante a lactação, os animais (8 por ninhada) foram mantidos em gaiolas de polietileno (51 x 36 x 16,5 cm). Como critério de seleção, apenas os filhotes acima de 6g no primeiro dia pós-parto foram incluídos no experimento.

Posteriormente, de forma aleatória foram selecionados 18 filhotes machos de cada grupo experimental, totalizando 72 filhotes. Desse total, 08 animais de cada grupo experimental, foram eutanasiados ao desmame (21 dias – 1^a etapa) e os outros 10 animais seguiram até o final do experimento (45 dias – 2^a etapa), sendo distribuídos em 4 animais por gaiola, que permaneceram se alimentando da mesma dieta das ratas (Figura 1). A gavagem de



todos os filhotes iniciou-se sempre no sétimo dia de vida, seguindo até o final do experimento.

Figura 1 – Fluxograma com a randomização dos animais nos grupos experimentais.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental (Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/UFPB) sob as condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas, iniciando o ciclo claro às 08h00), temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 65% (MERUSSE; LAPICHIK, 1996) de acordo com as normas estabelecidas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), recebendo água e comida *ad libitum* durante todo o período experimental.

O acompanhamento da evolução ponderal e do consumo alimentar das ratas e dos filhotes foi realizado uma vez por semana sempre no mesmo dia e horário.

4.3. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Durante a gestação e lactação a ração foi pesada e reposta a cada 2 dias, para quantificação do consumo semanal. Dessa forma, o controle do consumo, quantitativo e energético da ração foi realizado pesando-se o rejeito da ração, e subtraindo-o da quantidade ofertada a cada dois dias. No caso da prole, o consumo foi calculado de forma acumulativa ao final do período obtendo-se a média consumida por cada grupo ao término do experimento.

4.4. DETERMINAÇÕES PONDERAIS

4.4.1. Determinação do Peso Corporal

A partir da determinação da prenhez, as ratas tiveram acompanhamento semanal do peso corporal durante a gestação e lactação (0, 7º, 14º e 21º dias de gestação; e L0, L7, L14 e L21 de lactação). A partir do nascimento, as ninhadas também tiveram acompanhamento do peso corporal, sendo pesadas no dia do nascimento para obtenção da média do peso da cria (Peso dos filhotes \div nº de filhotes). Porém, um dia após o parto (d1), os animais foram novamente pesados e apenas os animais com 6g ou mais foram incluídos no experimento,

dessa forma, os mesmos tiveram o peso acompanhado semanalmente até o final do experimento (d7, d14, d20, d21, d28, d35, d42 e d45).

4.4.2. Avaliação Murinométrica e Determinação do Estado Nutricional

Com os animais anestesiados, ao final do experimento, foi possível realizar as medidas murinométricas: circunferência torácica (abaixo das patas dianteiras), circunferência abdominal (acima das patas traseiras) e o comprimento (da região nasal até o ânus), utilizando fita métrica inextensível, todas aferidas em cm. As realizações das medidas corporais serviram para calcular o Índice de Massa Corpórea (IMC), calculado pelo peso corporal (g)/comprimento² (cm²) (NOVELLI et al., 2007).

4.5. EUTANÁSIA

Ao desmame, as mães foram anestesiadas com xilazina (10 mg/kg) associada com quetamina (45 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, foi realizada a eutanásia por punção cardíaca, segundo princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O sangue foi utilizado para realização das dosagens bioquímicas. Neste mesmo dia também foram eutanasiados oito filhotes de cada grupo experimental, os mesmos foram anestesiados com quetamina (45mg/kg) associado com xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.) seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente. Os demais filhotes (dez filhotes de cada grupo experimental) foram eutanasiados 44 (± 1) dias após o nascimento, com a finalidade de comparar os parâmetros que foram influenciados pela alimentação materna ou pela alimentação pós-desmame.

4.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (descrito no tópico 4.5). Após a coleta, foram colocados 5mL de sangue em cada tubo que continha ativador de coágulos. Aproximadamente 20 minutos após cada coleta, as amostras foram centrifugadas a 5.8136 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenados em tubos eppendorfs sob refrigeração a -15°C até o dia da análise.

O soro foi utilizado para determinar a glicemia (Glicose Liquiform), as dosagens de Colesterol Total (CT) e Triglicerídeos (TG), ambos por meio enzimático. Já a Lipoproteína de Alta Densidade (HDL-c, do inglês *High Density Lipoprotein*) foi analisada por meio da Polietilenoglicol (PEG). Também foram analisadas as enzimas hepáticas Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotrasferase (AST), utilizando kits Labtest (ALT/TGP Liquiform e AST/TGO Liquiform, respectivamente). O cálculo da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL-c, do inglês *Low Density Lipoprotein*) e a Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL-c, do inglês *Very Low Density Lipoprotein*) foi realizado por meio das seguintes fórmulas: $LDLc = CT - HDL\text{ colesterol} - VLDL\text{ colesterol}$ e $VLDLc = TG \div 5$. A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro em 520nm para glicemia, 500nm para colesterol total, 600nm para HDL e 505nm para triglicerídeos, 340nm para ALT e AST, seguindo as recomendações do fabricante (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As concentrações foram determinadas em analisador automático Labmax 240 premium (Labtest, Minas Gerais, Brasil).

4.7. ANÁLISE DOS TECIDOS

O tecido adiposo visceral (intra-abdominal) dos animais foi coletado e pesado, após a eutanásia, sendo calculado em percentual com base na seguinte fórmula: (peso da gordura visceral/ peso ao final do experimento) x 100 (KISHINO et al., 2009). Igualmente foram pesados os tecidos hepáticos e o intestino para determinações da massa total.

4.7.1. Determinações morfológicas do intestino

Após a eutanásia, fragmentos do jejuno foram lavados com solução salina (NaCl a 0,9%), posteriormente foram retificados e medidos com um paquímetro sobre a bancada, sendo imediatamente acondicionados em solução fixadora de formol tamponado a 10% durante 48 horas. Após esse período, foi realizada lavagem em água corrente por um período de 12 horas, para que o excesso do fixador fosse retirado.

Em seguida, o material passou 72h em álcool a 70% e após este período, passou por sucessivas desidratações em álcool em graduações crescentes, iniciando com 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, trinta minutos cada. Posteriormente, o material passou pelo processo de diafanização em xitol. Em seguida, foi transferido para recipientes contendo parafina

histológica fundida, com ponto de fusão entre 54-56 °C. Ao fim deste procedimento, o material foi incluído em parafina para realização dos cortes histológicos transversais no micrótomo (Leica), para obtenção de um material com 5 μm . Em seguida, foi realizada a coloração utilizando os corantes Hematoxilina-Eosina (HE) (BEÇAK; PAULTE, 1976) e, por fim, montados com resina sintética (Entellan-Merck) para análise em microscópio.

A morfologia foi realizada utilizando-se um microscópio óptico (Motic BA 200) por meio da objetiva de 40x. A análise dos dados foi realizada o programa de imagens ImageLab2000. Foi avaliada a presença de padrões inflamatórios intestinais, como, estase, migração de células, hemorragia, vasodilatação, necrose, preservação epitelial, além de hipertrofia e hiperplasia da camada muscular lisa (KIM; ONG; OKUNO, 2002; PATURI et al., 2012).

Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Processamento de Material Biológico, localizado na Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.8. ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL

Para realizar a análise da microbiota fecal, um grama de fezes de cada animal foi suspenso em 9 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada (120°C/15min), transferindo-se 1 mL deste para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada também a 0,1% para obter a diluição 10^{-1} . Este procedimento foi realizado sucessivamente até obter a diluição 10^{-5} para definir a melhor diluição de contagem.

Para cada diluição, foram transferidas duas gotas das suspensões para as placas de Petri, utilizando-se micropipetas de 20 μL . A inoculação foi feita em meios de cultura seletivos previamente preparados, conforme é possível observar abaixo:

- Bactérias aeróbias e anaeróbias totais, utilizando-se o meio de cultura ágar Standard Methods (Acumedia, EUA), incubada em estufa a 37°C/48h, no caso das anaeróbias, incubadas em jarras de anaerobiose (EDLUND et al., 2000);
- *Lactobacillus* spp., utilizando-se ágar MRS (Merck, Alemanha) incubado em estufa a 37°C/48h em jarras de anaerobiose (Permution, Curitiba/Brasil) (YOSHIOKA et al., 1983);

- *Bifidobacterium* spp., utilizou-se o meio Bifidobacterium medium 25 – BIM-25, incubado em jarras de anaerobiose (Permution, Curitiba/Brasil) em estufa a 37°C/72h (MUÑOA; PARES, 1988);
- Enterobactérias, por meio do ágar MacConkey (Acumedia, EUA), incubada a 37°C/48h (BRIGIDI et al., 2001);
- *Bacteroides* spp. utilizou-se o ágar BBE (Acumedia, EUA) incubada a 37°C/72h em jarras de anaerobiose (Permution, Curitiba/Brasil) (LIVINGSTON et al., 1978).

Após o período de incubação respeitado para cada bactéria estudada, conforme descrito anteriormente, realizou-se a contagem e o número de microrganismos viáveis foi transformado em Unidade Formadora de Colônia (UFC) por g de fezes ($\text{UFC}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (SILVA et al., 2013). O cálculo da média e do desvio padrão foi realizado a partir dos valores de UFCg^{-1} em log10.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar se as variáveis seguiam a normalidade (paramétricos) foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$). Para analisar as diferenças médias entre consumo alimentar e evolução ponderal do peso em função da dieta e suplementação com soro de leite de cabra, bem como, a interação entre dieta e soro em função do tempo em cada um dos parâmetros foi utilizado a Análise de Variância de duas vias de medidas repetidas (Two-way repeated measures ANOVA). Para análise do peso úmido de órgãos, bioquímica, IMC, ganho de peso, foi utilizado ANOVA de uma via (*one way ANOVA*). Para o teste de comparações múltiplas entre os grupos foi usado o pós-teste de *Bonferroni*. Em todos os testes considerou-se a significância de 5% ($P < 0,05$). Em cada grupo de filhotes, um ou mais dados inconsistentes (*outliers*) foram retirados da análise, fazendo o total de animais variarem entre 7-10 por grupo. A análise estatística e elaboração das figuras foi realizada no Programa *GraphPad Prism* 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para fins comparativos, o grupo ocidentalizado suplementado (OSORO) foi comparado ao seu par controle (OSAL) ou ao grupo salina equivalente (CSORO).

5. RESULTADOS

O peso corporal médio das ratas ao início da gestação não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos (CSAL=250,0g; CSORO=239,2g; OSAL=249,0g; OSORO=253,3g, $p=0,47$). Durante a gestação, o ganho de peso dos grupos teve variação média de 51 g a 77 g, sem apresentar diferenças entre os grupos (Figura 2A). O mesmo ocorreu com os grupos durante a lactação, cuja variação média foi de -1,0g a -25g, $p=0,05$. Contudo, apesar desta variação negativa distinta entre os grupos (Figura 2B), o peso corporal final das mães ao sacrifício, não diferiu entre os grupos tratados.

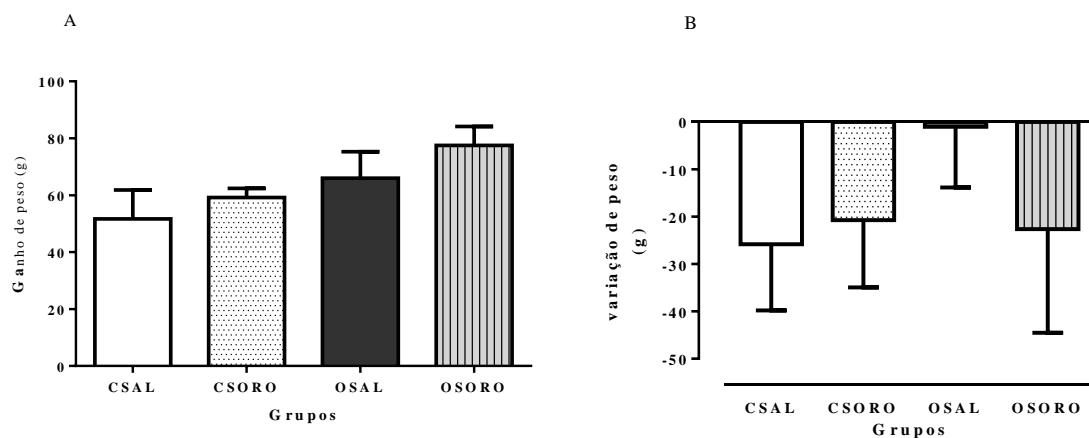


Figura 2 – Variação de peso corporal de ratas dos grupos que consumiram dieta controle ou dieta ocidentalizada durante o período gestacional (A) e lactacional (B). Dados expressos em média e desvio padrão da média (DP). Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni ($p>0,05$). CSAL: ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO: ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra.

Os filhotes da primeira etapa, oriundos de mães que consumiram dieta ocidentalizada, apresentaram maior peso corporal ($p<0,05$) ao final da lactação (Figura 3A), corroborado pelo maior percentual de ganho de peso (Figura 3B). Portanto, observa-se relevante interação no tempo [$F(9,87)=8,83$, $p<0,00$], pelo tratamento dietético [$F(3,87)= 413,69$, $p<0,00$]; e pela interação entre a dieta e o tempo [$F (29,87)=3,13$, $p<0,00$]. Contudo, fica evidente que a ingestão de soro de leite de cabra, reduziu o peso em ambos os grupos na segunda etapa do experimento (Figura 3C), com diferenças intergrupo ($p<0,05$), ou seja, entre CSALp2 e OSALp2 e entre CSOROp2 e OSOROp2 (Figura 3D).

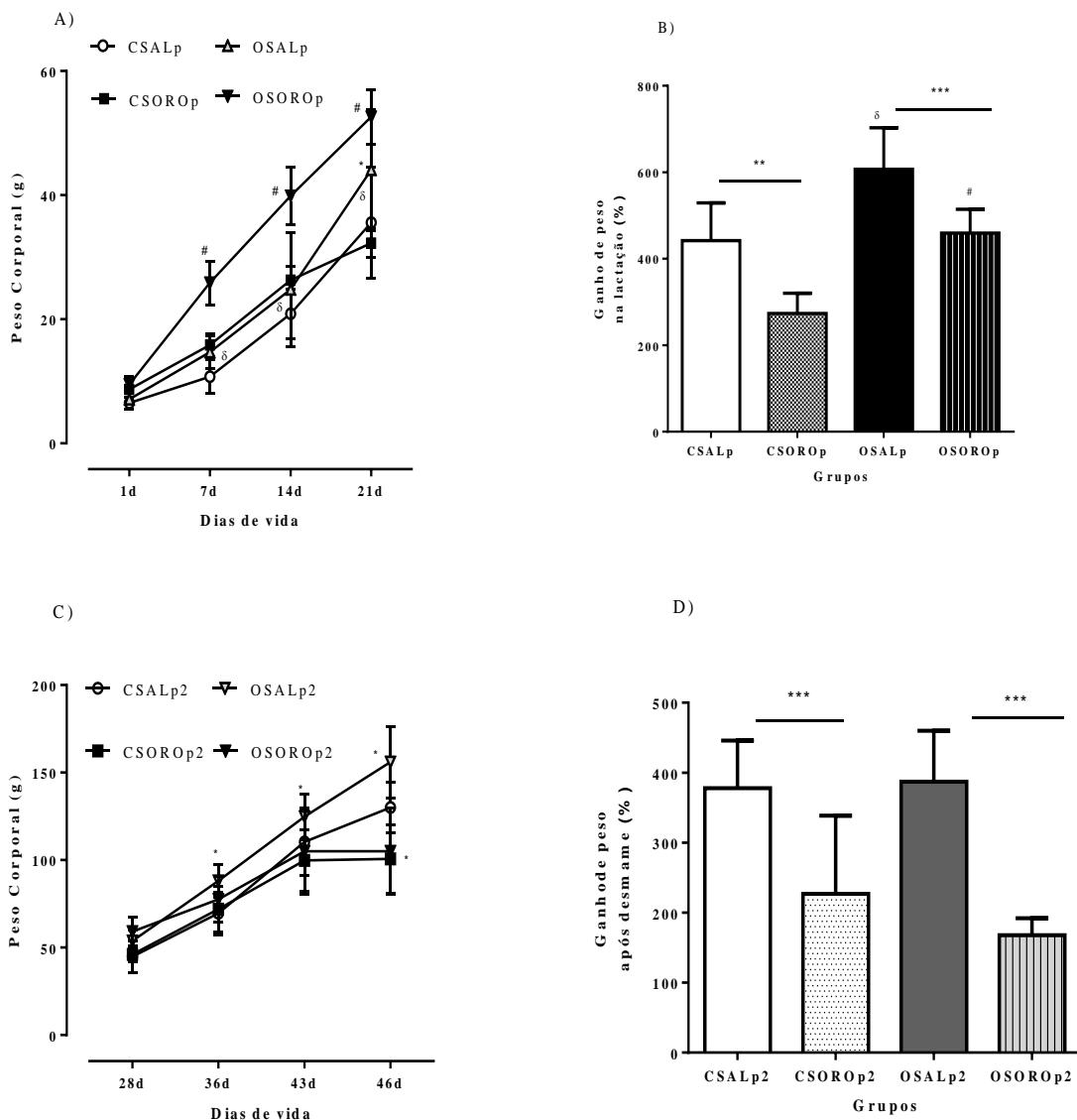


Figura 3 – Evolução ponderal de filhotes durante a lactação (3A) e após o desmame (3C), percentual de ganho de peso na lactação (3B) e após o desmame (3D) segundo manipulação dietética e suplemento de soro de leite de cabra. Dados apresentados em média \pm DP. (CSALp/p2= controle-salina, n=8; CSOROp/p2= controle-soro, n=7; OSALp/p2, ocidentalizada-salina, n=8; OSOROp/p2, ocidentalizada soro, n=8). Teste two way RM ANOVA (A) e teste one way ANOVA (B) seguido do pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs CSALp/p2; #p<0,05 vs CSOROp/p2; δvs OSOROp/p2. ***p<0,001.

Com relação ao consumo alimentar (Figura 4) durante a gestação (A) foi verificado um efeito do tempo ou semanas [$F(2,57)=4,71$, $p=0,01$] e do tratamento dietético dos grupos [$F(3,57)=13,62$, $p=0,00$], mas sem interação entre o tempo e tratamento dietético [$F(6,57)=0,98$, $p=0,013$]. Durante a lactação (B), foi verificado um relevante efeito das

semanas no consumo de alimento [$F(2,54)=9,20$], mas não do tratamento dietético dos grupos [$F(3,54)=0,26$, $p=0,086$].

O consumo alimentar acumulado da prole após o desmame demonstrou que a suplementação com soro de leite de cabra não modificou a ingestão nos grupos controles (CSALp2=192,8±26,4g; CSOROp2=196,7±21,7g), mas, alterou o consumo de dieta ocidentalizada, em que o grupo OSOROp2 apresentou uma ingestão maior que o OSALp2 (OSOROp2=187,9±6,5g; OSALp2=152,1±12,2g, $p<0,05$). Com relação ao consumo energético, o grupo OSOROp2 ingeriu maior quantidade de energia que o grupo OSALp2 e CSOROp2 (OSOROp2= 826,8±28,5kcal; OSALp2= 669,2±53,6kcal; CSOROp2= 727,7±80,4kcal; CSAL=713,3±97,5kcal, $p<0,05$).

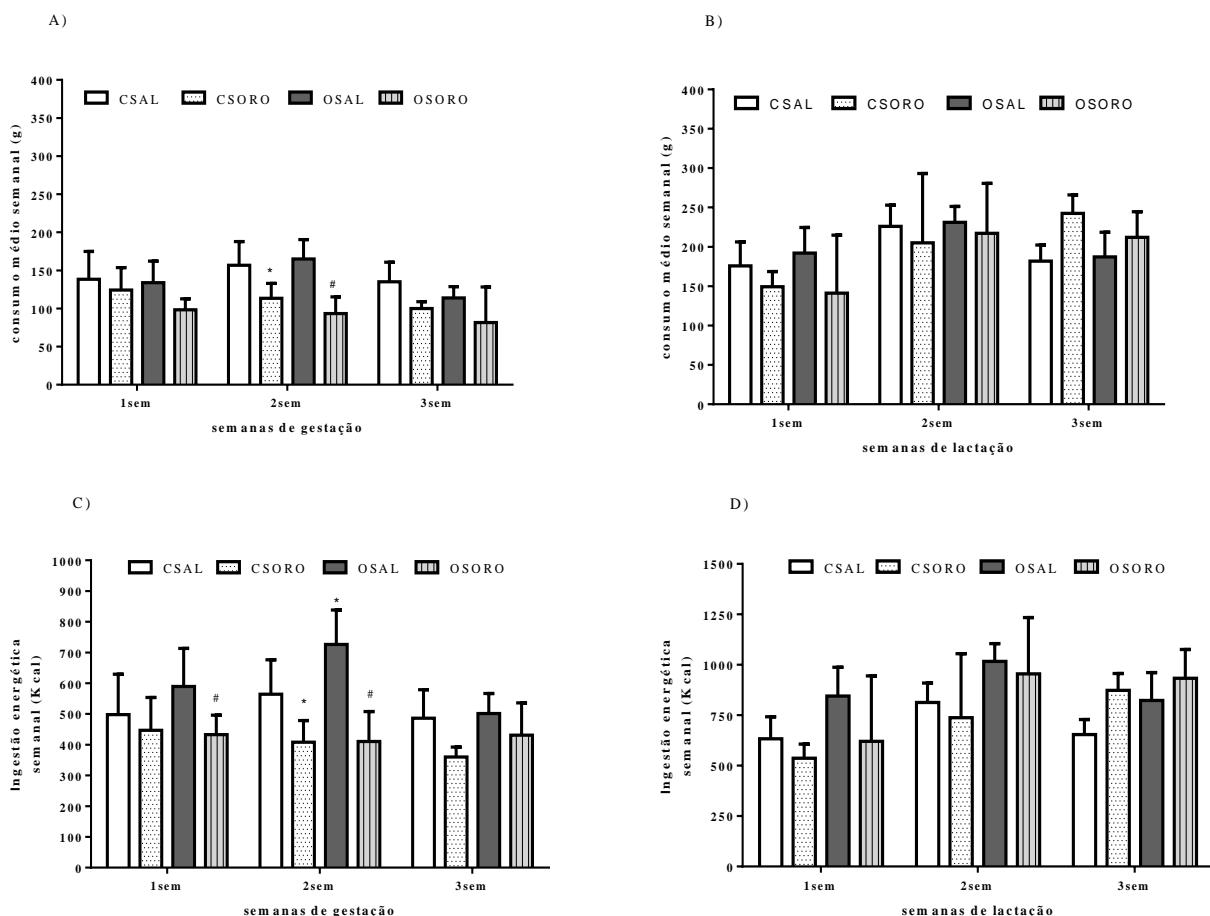


Figura 4 – Influência da dieta materna e da suplementação com soro de leite de cabra sobre a ingestão alimentar de ratas durante as semanas de gestação (A) e de lactação (B) e sobre o valor energético durante a gestação (C) e lactação (D). Dados expressos em média ±DP, resultados obtidos a partir do Teste two way RM ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ vs CSAL; # $p<0,05$ vs OSAL. CSAL: ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO: ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra.

Os parâmetros murinométricos e peso de órgãos das ratas, avaliado ao final do período lactacional, foram semelhantes entre os grupos ($p>0,05$). Em relação aos filhotes da primeira etapa do experimento (23 dias), foi possível observar que os grupos alimentados com dieta ocidentalizada apresentaram maiores parâmetros de IMC, CT e CA ($p<0,05$), independente da suplementação com soro de leite de cabra, quando comparados aos respectivos grupos alimentados com dieta controle (Tabela 3). Quanto ao peso relativo dos órgãos, o tecido adiposo abdominal mostrou-se elevado no grupo OSALp comparado ao CSALp e CSOROp. Mas, nenhuma diferença foi observada no peso úmido relativo (g/g ou g/100g) do fígado ou intestino.

Na segunda etapa do experimento, o grupo alimentado com dieta ocidentalizada e soro de leite de cabra, apresentou menor IMC e CT, sendo que o grupo OSALp2 apresentou IMC maior que os outros grupos do experimento ($p<0,05$), bem como a CT foi menor no CSOROp2 quando comparado a todos os grupos experimentais. Em relação ao peso relativo dos órgãos, foi verificado que a suplementação com soro de leite de cabra aumentou o tamanho do fígado em ambos os grupos suplementados independente da dieta consumida. O tecido adiposo abdominal apresentou-se maior nos animais do grupo OSALp2 comparado ao seu par controle CSALp2, mas sem diferenças nos grupos suplementados com soro de leite de cabra, sugerindo, um efeito benéfico da suplementação. E, para o intestino, o grupo OSOROp2 mostrou maior peso comparado ao CSOROp2 e ao OSALp2.

Tabela 3 - Parâmetros murinométricos e peso relativo dos órgãos de ratas, filhotes da 1^a etapa de experimento e 2^a etapa de experimento.

VARIÁVEIS	GRUPOS				Valor de p
	CSAL (n=6)	CSORO (n=6)	OSAL (n=6)	OSORO (n=6)	
Murinometria					
IMC	0,46±0,05	0,42±0,03	0,48±0,05	0,46±0,03	>0,05
CT	12,25±0,61	11,50±0,45	12,60±0,42	12,08±0,80	0,05
CA	13,83±1,13	12,33±0,98	13,80±1,15	13,42±0,92	>0,05
Peso eutanásia	236,67±34,45	203,33±21,37	249,00±31,30	220,00±20,25	0,05
Peso dos órgãos (g/100g de peso)					
Gordura abdominal	2,99±1,21	1,95±0,80	1,50±0,89	0,78±0,10	>0,05
Fígado	3,66±0,45	3,79±0,57	3,38±0,36	3,72±0,43	>0,05
Intestino	4,76±0,62	3,92±0,75	4,77±0,71	4,73±0,54	>0,05
Filhotes 23d					
CSALp (n=8)	CSOROp (n=7)	OSALp (n=8)	OSOROp (n=8)	Valor de p	
Murinometria					
IMC	0,25±0,04	0,27±0,03	0,31±0,04*	0,29±0,04	<0,05
CT	7,56±0,68	7,07±0,53	8,55±0,50*	8,63±0,74 [#]	<0,05
CA	8,19±0,70	7,21±0,64	8,87±0,55	8,94±0,82 [#]	<0,05
Peso eutanásia	35,01±9,43	32,36±2,29	49,75±4,34*	51,50±6,63 [#]	<0,05
Peso dos órgãos (g/g de peso)					
Gordura abdominal	0,005±0,004	0,005±0,001	0,012±0,003*	0,010±0,003 [#]	<0,05
Fígado	0,03±0,01	0,04±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	>0,05
Intestino	0,07±0,03	0,05±0,00	0,06±0,02	0,06±0,01	>0,05
Filhotes 45d					
CSALp ₂ (n=9)	CSOROp ₂ (n=10)	OSALp ₂ (n=10)	OSOROp ₂ (n=10)	Valor de p	
Murinometria					
IMC	0,40±0,03	0,34±0,04	0,47±0,04 * ^δ	0,38±0,06	<0,05
CT	10,56±0,73	9,78±0,75 * ^δ	11,05±0,60	10,45±0,76	<0,05
CA	12,0±0,83	11,39±0,93	12,15±1,20	11,85±1,27	>0,05
Peso eutanásia	122,78±16,79	96,50±14,82 *	156,00±20,39*	120,50±24,55 ^{&}	<0,05
Peso dos órgãos (g/100g de peso)					
Gordura abdominal	2,23±0,41	2,58±0,63	3,46±0,79*	3,23±1,05	<0,05
Fígado	3,77±0,32	4,90±0,96*	3,96±0,28	5,12±1,18 ^{&}	<0,05
Intestino	4,57±0,74	5,47±1,25	5,35±0,67	7,66±1,33	<0,05

Dados expressos em média±DP, resultados obtidos a partir do Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs CSAL; [#]p<0,05 vs CSORO; [&]p<0,05 vs OSAL; ^δvs OSORO. CSAL: ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO: ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra.

Não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos das ratas ($p>0,05$), contudo, aos 23 dias de vida, os filhotes do grupo CSOROp apresentaram alterações na maioria dos parâmetros bioquímicos mensurados (glicemia, AST, LDLc, HDLc) quando comparado ao CSALp ou ao OSOROp (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de ratas, filhotes da 1^a etapa e 2^a etapa do experimento.

Parâmetros Bioquímicos		Grupos			Valor de p
Ratas	CSAL (n=6)	CSORO (n=6)	OSAL (n=6)	OSORO (n=6)	
Glicemia	178,40±52,29	154,20±56,28	175,0±20,55	164,00±33,82	>0,05
ALT	101,60±37,06	94,00±35,01	66,20±7,60	58,20±29,42	>0,05
AST	254,80±56,71	200,20±55,11	197,0±12,55	141,40±30,56	>0,05
CT	64,20±16,93	84,80±27,00	100,20±31,85	69,60±20,44	>0,05
TG	52,40±15,71	43,60±10,61	64,80±24,00	46,40±9,32	>0,05
HDL	25,80±6,34	28,00±8,54	31,40±9,10	28,40±10,92	>0,05
LDL	27,92±8,94	48,08±19,40	55,84±20,59	31,92±12,74	>0,05
VLDL	10,48±3,14	8,72±2,16	12,96±4,80	9,28±1,86	>0,05
Filhotes 23d		CSALp (n=8)	CSOROp (n=7)	OSALp (n=8)	OSOROp (n=8)
Glicemia	102,20±12,33	141,30±20,16*	108,80±21,14	111,50±9,89 [#]	<0,05
ALT	32,50±7,84	41,29±8,79	28,00±5,50	30,75±4,74 [#]	<0,05
AST	313,60±53,01	499,43±69,84*	242,70±60,69	290,90±33,28 [#]	<0,05
CT	127,75±24,57	119,71±8,67	124,75±15,27	122,13±20,75	>0,05
TG	125,38±11,95	75,20±9,39*	97,60±12,24	115,50±20,88 [#]	<0,05
HDL	30,50±4,93	17,71±1,60	29,00±5,58	28,88±5,82	<0,05
LDL	68,93±14,92	66,53±12,63	66,53±12,63	63,45±12,07	<0,05
VLDL	25,16±2,39	15,04±1,88*	19,52±2,45	23,10±4,18 [#]	<0,05
Filhotes 45d		CSALp ₂ (n=10)	CSOROp ₂ (n=10)	OSALp ₂ (n=10)	OSOROp ₂ (n=10)
Glicemia	78,14±8,59	95,00±17,73	134,00±24,03*	149,30±19,78 [#]	<0,05
ALT	32,78±8,09	32,50±4,60	44,90±9,21	41,30±12,20	<0,05
AST	227,20±37,62	246,70±47,36	299,70±33,5*	145,10±19,77 [#] &	<0,05
CT	69,33±8,86	130,20±23,13*	81,50±10,23	73,50±5,25 [#]	<0,05
TG	51,13±17,12	206,20±19,54*	41,00±12,52	59,090±10,22 [#]	<0,05
HDL	24,89±4,20	27,40±3,84	28,80±3,49	32,10±2,33	<0,05
LDL	33,02±7,82	86,32±7,50*	43,80±8,57	30,54±3,47 [#]	<0,05
VLDL	11,42±4,81	43,28±6,46 *	8,90±3,24	11,80±2,06 [#]	<0,05

Dados expressos em média±DP, resultados obtidos a partir do Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ vs CSALp/p2; [#] $p<0,05$ vs CSORO p/p2; [&] $p<0,05$ vs OSALp/p2.

Aos 45 dias de vida os grupos que continuaram a ingerir dieta ocidentalizada, independentemente da suplementação com soro exibiram elevados níveis glicêmicos. Contudo, o uso de soro pelo grupo ocidentalizado reduziu os níveis de AST, triglicerídeos, colesterol, LDLc e VLDLc comparado ao CSOROp2. Porém, tal resultado merece cautela de

interpretação visto que todos esses parâmetros mostraram-se elevados em CSOROp2 comparados ao CSALp2 e não houve grandes diferenças entre OSOROp2 e OSALp2, exceto, evidente redução da AST no grupo OSOROp2 comparado ao OSALp2 ($p<0,05$) (Tabela 4).

A suplementação de soro de leite de cabra nas ratas durante a gestação e lactação, não modificou a contagem do gênero *Lactobacillus* na avaliação intragrupo nos controles, ($CSAL=6,43\pm0,35$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO=6,94\pm0,49$ log.UFC/g⁻¹) nem entre os grupos com dieta ocidentalizada ($OSAL=7,34\pm0,09$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,78\pm0,35$ log.UFC/g⁻¹). Porém, os grupos com a dieta suplementada com soro apresentaram maior contagem de *Lactobacillus* do que seus pares ($OSAL=7,34\pm0,08$ log.UFC/g⁻¹; $CSAL=6,43\pm0,31$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,79\pm0,30$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO=6,94\pm0,45$ log.UFC/g⁻¹). Para o grupo das bactérias anaeróbias, a suplementação com soro de leite de cabra diminuiu a contagem desses micro-organismos tanto no grupo controle ($CSAL= 7,58\pm0,37$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO= 6,94\pm0,29$ log.UFC/g⁻¹) quanto no grupo ocidentalizado ($OSAL= 8,08\pm0,06$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO= 7,02\pm0,23$ log.UFC/g⁻¹). Quanto ao gênero das bifidobactérias e anaeróbias totais, não foram observadas nas ratas nenhuma diferença decorrente dos tratamentos utilizados.

Nos filhotes não foram verificadas diferenças estatísticas ($p<0,05$), com exceção do gênero *Lactobacillus* que estavam mais elevados nos grupos suplementados com soro comparados aos seus pares ($CSALp_2 =6,31\pm0,57$ log.UFC/g⁻¹; $CSOROp_2=7,30\pm0,11$ log.UFC/g⁻¹; $OSALp_2= 6,66\pm0,14$ log.UFC/g-1; $OSOROp_2=7,40\pm0,29$ log.UFC/g⁻¹) para o, conforme é possível observar na Figura 5. Nos filhotes aos 45 dias também avaliamos a contagem de Enterobactérias (aeróbias) e *Bacteroides* (anaeróbios) obtendo os seguintes resultados: o grupo OSALp2 mostrou menor quantidade das enterobactérias de aproximadamente 0,92 ciclos logarítmicos para o grupo CSALp2 e o OSOROp2 ($OSALp_2=6,85\pm0,26$; $CSALp_2=7,77\pm0,35$; $OSOROp_2=7,76\pm0,41$ log.UFC/g-1) e na classe de *Bacteroides*, o grupo OSALp2 também foi menor que o grupo OSOROp2 na ordem de 0,12 ciclos logarítmicos ($OSAL = 7,15\pm0,12$; $OSORO= 7,62\pm0,10$ log.UFC/g⁻¹).

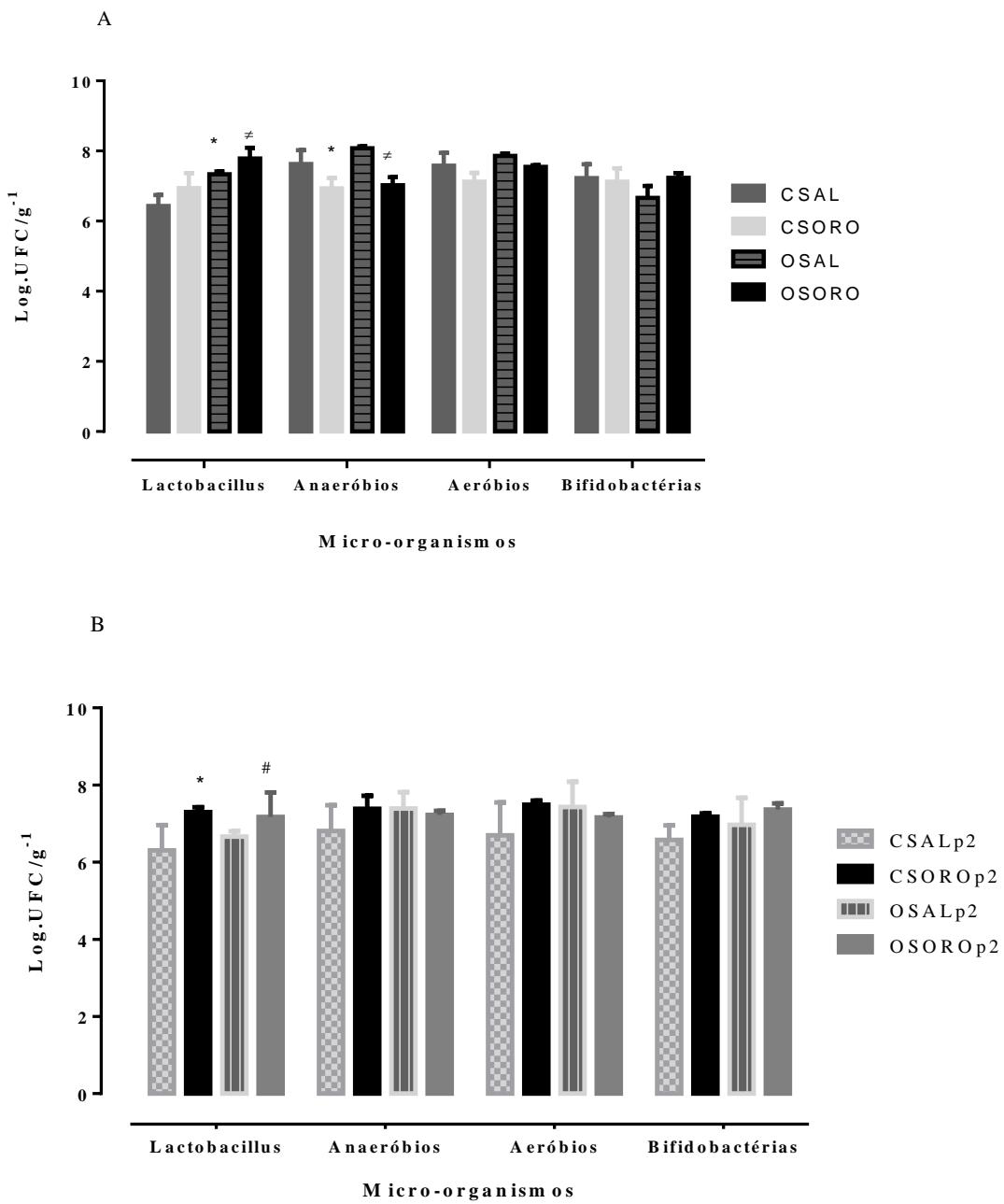


Figura 5 – Médias das populações de micro-organismos nas amostras de fezes cultivados em aerobiose (Bactérias aeróbias) e anaerobiose (*Lactobacillus*, *Bifidobactérias* e *Anaeróbios*), de ratas (A) e de filhotes (B) alimentados com dieta controle ou ocidentalizada e tratados com solução salina ou soro de leite de cabra. Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Dados expressos em Log10 do número de unidades formadoras de colônia/mL). * $p<0,05$ vs CSAL e # $p<0,05$ vs CSORO. CSAL: ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO: ratas alimentadas com dieta controle e suplemento com soro de leite de cabra; OSORO: ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplemento com soro de leite de cabra.

A avaliação morfológica foi realizada por meio da análise histológica das células intestinais, especificamente no jejuno. Foi possível observar, que as ratas do grupo controle alimentadas com dieta ocidentalizada (OSAL) apresentaram desgaste epitelial, destruição e necrose das vilosidades, além de hemorragia central com perda da arquitetura tecidual. Porém, nas ratas que receberam a dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite, houve a ausência do processo inflamatório assemelhando-se aos animais do grupo controle (Figura 6A).

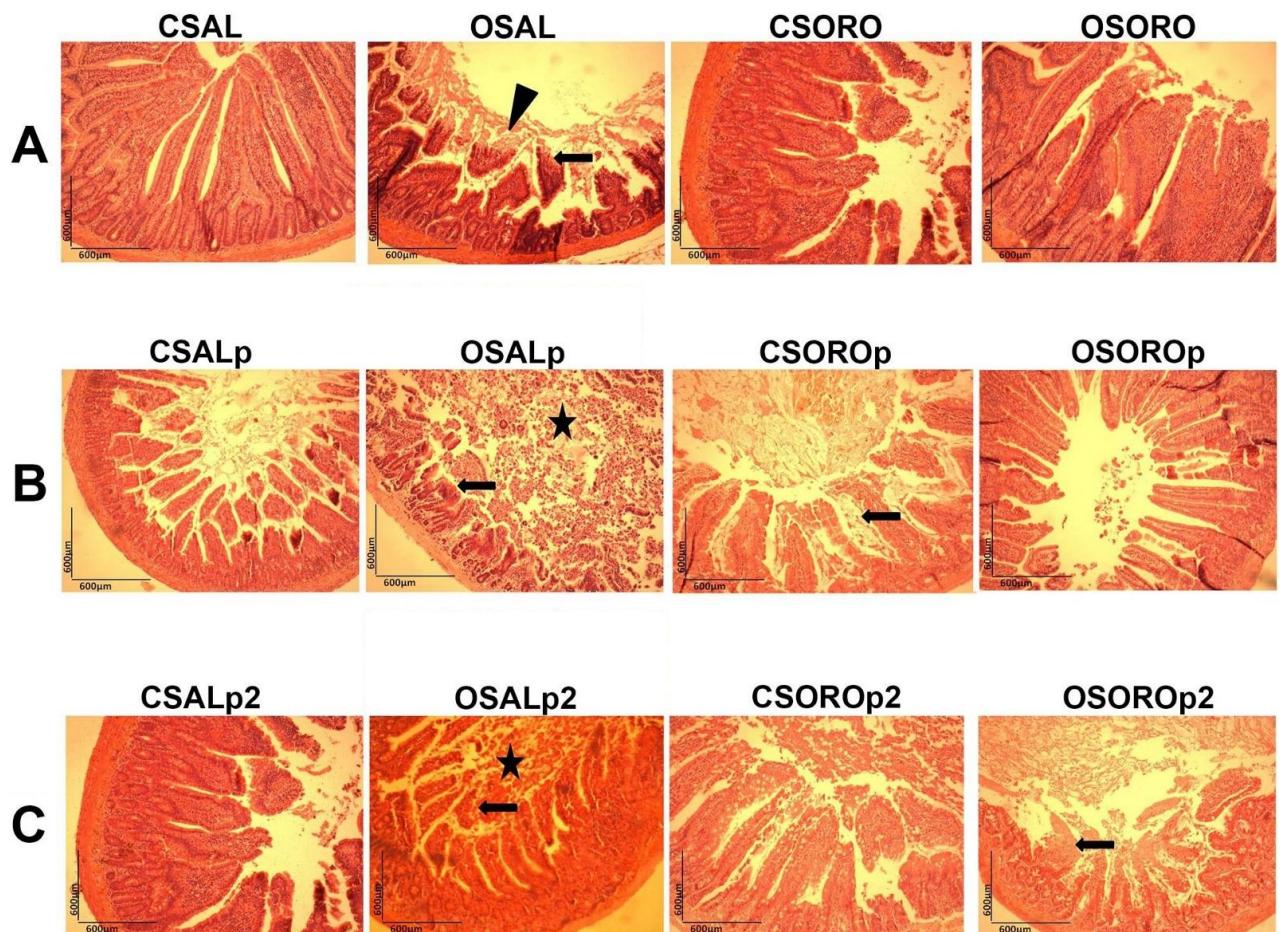


Figura 6 – Histologia do jejuno de ratas (A), filhotes aos 23 dias (B) e filhotes aos 45 (C) dias. Imagem de microscopia com aumento de 40x. Seta: destruição epitelial. Estrela: exsudato inflamatório. Triângulo: necrose.

Resultados semelhantes foram encontrados na prole aos 23 dias de vida (Figura 6B). Contudo, observou-se que nos filhotes alimentados com dieta ocidentalizada (OSALp) por maior período de tempo, ocorreu um agravamento do desgaste epitelial e da destruição das vilosidades. Mas, a suplementação com soro de leite de cabra em um período maior

(OSOROp2) também minimizou estes impactos adversos e não se observou processo inflamatório (Figura 6C).

6. DISCUSSÃO

A dieta ocidentalizada, caracterizada pelo excesso de lipídeos, sódio, açúcar e alimentos processados associados ao reduzido teor de fibras alimentares, tem sido associada ao aumento de doenças metabólicas, bem como o aumento da prevalência de obesidade (CRESCENZO et al., 2008). No nosso estudo, foi ofertado a mães e a prole jovem, uma dieta experimental, estilo dieta ocidental, e investigado seus efeitos sobre estado nutricional, microbiota e morfologia intestinal associada ou não a ingestão de soro de leite de cabra.

Sobre o peso corporal, a murinometria e o consumo alimentar das ratas durante gestação e lactação, não se observou alteração decorrente da dieta ou da suplementação. Contudo, foi observado nos filhotes do grupo ocidentalizado, a seguir ao desmame, um aumento das medidas murinométricas e do peso corporal durante a lactação. No entanto, com a continuidade da suplementação, houve redução do ganho de peso e de medidas murinométricas nos grupos suplementados com soro de leite de cabra, apesar da pouca influência observada sobre o consumo alimentar ou energético. Os resultados de peso e consumo detectados nas mães e filhotes, corroboram os observados por Cavalcante et al., (2013) que utilizaram semelhante dieta. O menor ganho de peso encontrado nos filhotes que receberam suplementação com soro de leite de cabra está em acordo com o estudo de Tranberg et al. (2013) que ao substituir na dieta a proteína caseína por proteína oriunda do soro de leite de vaca, também verificou menor ganho ponderal. Em concordância também com os resultados de Shertzer et al. (2011), ao adicionar proteína do soro a uma dieta elevada em gordura relatou menor ganho de peso em ratos. Os resultados convergem para projetarmos a hipótese que a fonte proteica pode interferir sobre o ganho de peso corporal. Estudo utilizando duas fontes proteicas distintas (carne vermelha *v.s.* proteína do soro de leite de vaca-*whey protein*) também observou menor ganho ponderal para o grupo suplementado com proteína de soro de leite de vaca (BELOBRAJDIC; MCINTOSH; OWENS, 2004).

A diferente composição aminoacídica das fontes proteicas pode estar envolvida na colonização da microbiota intestinal. A suplementação de ratos com solução bacteriana de *Lactobacillus plantarum* comparada a outros tipos de suplementos bacterianos também reduziu o ganho de peso e a gordura corporal (KARLSSON et al., 2011). Outro estudo conduzido com a suplementação de *Lactobacillus reuteri* (presente no iogurte) observou semelhante perfil com a redução de ganho de peso em camundongos alimentados que se alimentaram com dieta ocidentalizada (POUTAHIDIS et al., 2013). Vale salientar que neste

estudo foi detectado um maior número de *Lactobacillus* na prole suplementada comparada aos seus pares não suplementados. O conjunto de resultados sugere que a dieta e/ou o alimento/nutriente parece interferir na colonização microbiana e que esta por sua vez influencia notavelmente o ganho de peso corporal. Entretanto, é importante salientar que dietas com elevados teores de gordura, particularmente, a saturada, podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, independente do peso corporal global (BUIJSSE et al., 2015).

Porém, mais que o peso corporal total, a gordura da região abdominal/visceral é considerada uma das mais deletérias para o surgimento de distúrbios metabólicos. Nossos resultados demonstram que a dieta ocidentalizada promoveu maior depósito de gordura abdominal nos filhotes aos 23 dias de idade. Porém, a continuidade da prole ingerindo dieta ocidentalizada associada à suplementação do soro aboliu a significância encontrada aos 23 dias no grupo que consumiu dieta ocidentalizada e soro, mas no grupo não suplementado com soro caprino a magnitude de diferença da gordura corporal atingiu 55% a mais no OSALp2 comparado ao CSALp2. O efeito da dieta ocidentalizada sobre o aumento da quantidade de gordura abdominal também é referido em estudos prévios (CAVALCANTE et al., 2014; POUTAHIDIS et al., 2013). Um estudo utilizando suplementação com *Lactobacillus reuteri* em camundongos alimentados com dieta ocidentalizada durante 8 semanas, também reduziu a quantidade de gordura na região visceral (POUTAHIDIS et al., 2013).

A maior quantidade de gordura visceral observada nos filhotes alimentados com dieta ocidentalizada corrobora com resultados prévios utilizando dietas semelhantes (PERÉZ et al., 2015; BAUTISTA et al.; 2016). O aumento na gordura visceral do grupo ocidentalizado manteve-se nos filhotes aos 45 dias, mas, se observa ausência de significância no grupo suplementado com soro sugerindo um efeito positivo da suplementação nesse grupo. Outros estudos, porém, demonstram que animais alimentados com dieta padrão e suplementados com oligossacarídeos do leite caprino apresentaram aumento da gordura (THUM et al., 2016).

No presente estudo, o maior peso encontrado no fígado pode ter sido decorrente da suplementação com soro de leite de cabra e não pela ingestão da dieta ocidentalizada, tendo em vista que nos estudos realizados por Cavalcante et al. (2014) e Bautista et al. (2016) não foi observado aumento do peso deste órgão em animais que consumiram dieta ocidentalizada apenas durante o período perinatal. Igualmente, no estudo de López-Aliaga et al. (2005), a suplementação da dieta com leite de cabra não determinou diferenças significantes no peso do fígado. Porém, Rodrigues et al., (2014) observaram esteatose hepática em ratos alimentados com leite de cabra rico em ácido linoleico conjugado. Como não foram investigados possíveis

fatores que possam explicar o aumento do peso do fígado, suspeitamos que algum dano hepático possa ter sido desenvolvido haja vista as alterações encontradas.

Os parâmetros bioquímicos também são utilizados para verificar os impactos da dieta ocidentalizada. As dosagens bioquímicas não revelaram significância no grupo das ratas. Contudo, nos filhotes aos 23 dias, diversos dos parâmetros analisados exibem aumento como a glicemia e a AST nos animais alimentados com dieta controle (caseína) e suplementados com soro, e redução dos triglicerídeos e VLDL-c nos animais suplementados com soro de leite, independente da dieta ingerida. As diferenças glicêmicas por sua vez foram oriundas da dieta e não da suplementação com soro. A elevação de transaminase em animais com dieta ocidentalizada também se mostra presente em outros estudos (PERÉZ et al., 2015). No que confere as dosagens de triglicérides, colesterol total e frações, o uso do soro nos animais com dieta ocidentalizada mostram efeitos opostos àqueles com dieta controle. Esse resultado difere do de Peréz et al. (2015) cujos animais alimentados com dieta rica em lipídios por todo o período experimental mostra elevação de colesterol e ALT, contudo, vale ressaltar que a dieta foi ofertada por maior período de tempo o que pode favorecer a instalação de dislipidemia.

Quanto ao estudo da microbiota e morfologia, observa-se evidente efeito da dieta ocidentalizada e do soro. A dieta é um modulador da microbiota, na qual a ocidentalizada é conhecida por aumentar as bactérias do filo *Firmicutes*, que podem estar associadas a prejuízos à saúde humana (LEY et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a suplementação com o soro aumenta o número de lactobacilos totais tanto nas ratas como nos filhotes. Ratos alimentados com dieta ocidentalizada acrescida de soro de leite aumentaram a quantidade de lactobacilos totais e bifidobactérias (SPRONG; SCHONEWILLE; VAN-DER, 2010), e que, quando adicionada de oligossacarídeos como inulina e oligofrutose também evidenciaram aumento de *Lactobacillus* (LICHT et al., 2006). Igualmente o uso da fração isolada de oligossacarídeos do soro de leite de cabra causou aumento tanto a fração de lactobacilos quanto de bifidobactérias em ratos (LARA-VILLOSLADA et al., 2006). Os oligossacarídeos encontram-se em maiores concentrações no leite de cabra que no leite bovino e tem potencial efeito na redução do processo inflamatório (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006).

Apesar da contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias totais ter se mostrado inalterada, observamos que nos filhotes aos 45 dias a quantidade de Enterobactérias e *Bacteroides* do grupo ocidentalizado suplementado com soro aumentou quando comparado aos seus pares. Outro estudo também demonstrou que houve uma redução da contagem dessas bactérias nas fezes e no intestino de humanos (TURNBAUGH et al., 2009). Contudo, o

período de suplementação e a dose utilizada podem não ter sido suficientes para demonstrar uma significância entre o grupo experimental e controle.

Previvamente foi demonstrado que a ingestão de dieta ocidentalizada (elevada em gordura e carboidratos simples) alterou a morfologia intestinal com lesões intestinais e infiltrado de células inflamatórias observada em ratas e filhotes (ZHOU et al., 2014). Nossos resultados demonstram que a adição de soro de leite de cabra minimizou os impactos causados pelo consumo de dieta ocidentalizada. Parte desse efeito pode ser atribuída à presença de oligossacarídeos no soro de leite de cabra (potencial prebiótico) que atua como agente anti-inflamatório na doença inflamatória intestinal (DADDAOUA et al., 2006; SPRONG; SCHONEWILLE; VAN-DER, 2010). De modo semelhante, estudo realizado por Mehel et al. (2014) demonstrou que ratos desnutridos que receberam um composto contendo probióticos e prebióticos apresentaram uma melhora nos parâmetros relacionados à morfometria do intestino delgado, como a restauração das vilosidades e criptas intestinais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que o soro de leite de cabra minimizou os impactos causados pela dieta ocidentalizada oferecida durante o período gestacional e lactacional de ratas, no que diz respeito à histologia intestinal e microbiota fecal das ratas. Porém, nos filhotes, a suplementação parece ainda ter minimizado o ganho de peso corporal na prole, independente da dieta consumida. Além disso, os filhotes apresentaram melhora nos aspectos relacionados à gordura abdominal, microbiota e preservação da morfologia intestinal.

Contudo, é importante destacar que apesar de apresentarmos de maneira pioneira resultados referentes ao soro de leite de cabra como provável composto prebiótico para auxiliar na melhora dos perfis de animais alimentados com dietas ocidentalizadas, conforme supracitado há necessidade de se compreender melhor a dose e volume da suplementação com o soro, sobretudo o período adequado para se observar melhor os efeitos dessa associação.

Sugere-se, portanto, que estudos posteriores sejam realizados possibilitando novas análises relativas à histologia hepática e gástrica, além de outras dosagens enzimáticas e moleculares.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, T. R. et al. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. **J Ped Gastro Nutr**, v. 49, n. 3, p. 349-354, 2009.

AFUWAPE, A.; O.; TURNER, M. W.; STROBEL, S. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. **Clin Exp Immunol**, v. 136, n.1, p. 40-48, 2004.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION . Position of the American Dietetic Association: functional foods. **J Am Diet Assoc**, v. 109, p. 735-746, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis the of Association of Analytical Chemists International**. 18th. Washington: AOAC, 2010.

ARRIETA, M. C. et al. The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. **Front Immuno**, v. 5, p. 1-18, 2014.

ASTRUP, A. et al. The role of fast food in nutritional transition in China. **Obesity Reviews**, v. 9, sup. 1, p. 48–52.

BAUTISTA, C. J. et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. **Br J Nutr**, v. 115, n. 3, p. 538-546, 2016.

BEÇAK, W.; PAULTE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A., 1976, 305p.

BELOBRAJDIC, D. P.; MCINTOSH, G. H.; OWENS, J. A. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar rats. **J Nutr**, v. 134, n. 6, p. 1454-1456.

BHAT, Z.; BHAT, H. Milk and dairy products as functional foods: a review. **Int J Dairy Sci**, v. 6, p. 1–12, 2011.

BOEHM, G.; STAHL, B. Oligosaccharides from milk. **J Nutr**, v. 137, 847S–849S, 2007.

BOMFIM, M. A. D. et al. Abordagem multidisciplinar de P, D&I para o desenvolvimento de produto lácteo caprino com alto teor de CLA e alegação de propriedade funcional. **Rev Bras Zootec**, v. 40, p.98-106, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, n. 07, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.

BRIGIDI, P. et al. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Res Microbiol**, v. 152, n. 8, p. 735-41, 2001.

BROWN, K. et al. Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. **Nutrients**. n. 4, v. 8, 1095-1119, 2012.

BUIJSSE, B. et al. Consumption of fatty foods and incident type 2 diabetes in populations from eight European countries. **Eur J Clin Nutr**, v. 69, n. 4, p. 455-461, 2015.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Méd Mal Infec**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014.

CAVALCANTE, C. F. et al. Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. **Int J Food Sci Nutr**, v. 65, n. 8, p. 989-993, 2014.

CAVALCANTE, T. C. F. et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, p. 1157-1168, 2013.

CHIOU, YI-SHIOU et al. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. **J Funct Foods**, v. 7, p. 3-25, 2014.

CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gutmicrobiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

COHEN, E. et al. Social valorisation of stoutness as a determinant of obesity in the context of nutritional transition in Cameroon: The Bamiléké case. **Soc Sci Med**, v. 96, p. 24-32, 2013.

COLLADO, Maria Carmen et al. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 352-365, 2012.

COX, L. M. et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequence. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 705-721, 2014.

CRESCENZO, R. et al. Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. **Obesity**, v. 16, n. 5, p. 958-964, 2008.

DADDAAOUA, A. et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapteninduced colitis. **J Nutr**, v.136, n.3, p.672-676, 2006.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from europe and rural africa. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, n. 33, p. 14691 – 14696, 2010.

DEMIGNÉ, C. et al. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. **Eur J Nutr.**, n. 45, p. 298- 306, 2006.

DORÉ, J. et al. Hot topics in gut microbiota. **United European Gastroenterology Journal**, v. 1, n. 5, p. 311-318, 2013.

EDLUND, C., BEYER, G., HIEMER-BAU, M., et al. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora. **Scand J Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 81-5, 2000.

ETXEBERRIA, U. et al. Shifts in microbiota species and fermentation products in a dietary model enriched in fat and sucrose. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 3, p. 1-15, 2015.

FAO/WHO (2002). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2014.

FLINT, H. J. The impact of nutrition on the human microbiome. **Nutrition Reviews**, v. 70, sup. 1, p. S10-S13, 2012.

FORBES, J. M. Glucose homeostasis can be differentially modulated by varying individual components of a western diet. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 7, p. 1251-1257, 2013.

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

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Reviews**, v. 17, v. 2, p. 259-275, 2004.

GRÖNLUND, M-M. et al. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. **Gut Microbes**, v. 2, n. 4, p. 227-233, 2011.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Res**, v. 51, p. 155-163, 2004.

ISHIMOTO, T. et al. High-Fat and High-Sucrose (Western) Diet Induces Steatohepatitis That Is Dependent on Fructokinase. **Hepatology**, v. 58, n. 5, 1632-1649, 2013.

JEFFERY, I.; O'TOOLE, P. W. Diet-Microbiota Interactions and Their Implications for Healthy Living. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 234-252, 2013.

JOHNSON, A. M. F. et al. High Fat Diet Causes Depletion of Intestinal Eosinophils Associated with Intestinal Permeability. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1-15, 2015.

KAHN, B. B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, p. 473-81, 2000.

KARLSSON, C. L. J. et al. Effects on weight gain and gut microbiota in rats given bacterial supplements and a high-energy-dense diet from fetal life through to 6 months of age. **Br J Nutr**, v. 106, n. 6, p. 887-895, 2011.

KIM, K. H.; ONG, J. L.; OKUNO, O. The effect of filler loading and morphology on the mechanical properties of contemporary composites. **J Prosthet Dent**, v. 87, n. 6, p. 642-649, 2002.

KISHINO, S. et al. Microbial production of conjugated y-linolenic acid from y-linolenic acid by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2012-2018, 2010.

KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELOS-BOURBOULIS, E. J.; STAVROU, G. Obesity as a Consequence of Gut Bacteria and Diet Interactions. **ISRN Obesity**, v. 2014, 2014.

LARA-VILLOSLADA, F. et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Clin Nutr**, v. 25, n. 3, p. 477-488, 2006.

LARSEN, N. et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **Plos One**, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2010.

LEMKE, K. A. Perioperative use of selective alpha-2 agonists and antagonist in small animals. **Can Vet J**, v. 45, n. 6, p. 475-80, 2004.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Nature**, v. 444, 2005.

LICHT, T. R. et al. Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 8, 2006.

LIVINGSTON, S.J.; KOMINOS, S.D.; YEE, R.B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **J Clin Microbiol**, v. 7, p. 448- 453, 1978.

LÓPEZ-ALIAGA, I. et al. Goat Milk Feeding Causes an Increase in Biliary Secretion of Cholesterol and a Decrease in Plasma Cholesterol Levels in Rats. **J Dairy Sci**, v. 88, n. 3, 2005.

MARIAT, D. et al. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 123, p. 1-6, 2009.

MARINI, R. P. Cardiovascular pathology possibly associated with ketamine/xylazine anesthesia in dutch belted rabbits. **Lab Anim Sci**, v. 49, n. 2, 153-60, 1999.

MARTÍN, R. et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. **J Hum Lac**, v. 21, n. 1, p. 8-17, 2005.

MARTINEZ-FEREZ, A. et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **Int Dairy J**, v. 16, n. 2, p. 173-181, feb. 2006.

MEHEL, B. B. et al. Probiotic oligosaccharides improve the recovery of intestinal mucosa and biochemicals parameters in malnourished rats. **Int J Nutr Metabol**, v. 6, n. 2, p. 28-36, 2014.

MERUSSE, J.L.B.; LAPICHIK, V.B.V. Instalações e equipamentos. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: EPM, 1996. 259p.

MOZAFFARIAN, D. et al. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. **N Engl J Med**, v. 364, p. 2392-2404, 2011.

MOZES, S. et al. Developmental changes of gut microflora and enzyme activity in rat pups exposed to fat-rich diet. **Obesity**, v. 16, n. 12, p. 2610-2615, 2008.

MUGAMBI, M. N. et al. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. **Nutr J**, v. 11, n. 81, p. 1-32, 2012.

MUÑOA, F.J., PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Appl Environ Microbiol.**, v. 54, n. 7, p. 1715-8, 1988.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Small Ruminants.** National Academic Press. Washington, DC, p 271–280, 2007.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim.**, v. 41, p. 111-119, 2007.

OLIVEIRA, D. L. et al. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of caprine cheese whey oligosaccharides in batch culture systems. **Bio Factors**, v. 38, n. 6, p. 440–449, 2012.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol**, v. 5, n. 7, e177, 2007.

PATURI, G. et al. Effects of potato fiber and potato-resistant starch on biomarkers of colonic health in rats fed diets containing red meat. **J Food Sci**, v. 77, p. 215-223, 2012.

PERÉZ, G. S. et al. Maternal and post-weaning exposure to a high fat diet promotes visceral obesity and hepatic steatosis in adult rats. **Nutr Hosp.**, v. 32, n. 4, p. 1653-1658, 2015.

PESSI, T. et al. Probiotics reinforce mucosal degradation of antigens in rats: implications for therapeutic use of probiotics. **J Nutr**, v. 128, n. 12, p. 2313-2318, 1998.

PISABARRO, R.E., SANGUINETTI, C., STOLL, M., et al. High Incidence of Type 2 Diabetes in Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 2 Pro12Ala Carriers Exposed to a High Chronic Intake of Trans Fatty Acids and Saturated Fatty Acids. **Diabetes Care**, v. 27, n. 9, 2004.

POPKIN, B. M. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 871S-873S, 2001.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; WEN, S. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition – The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutr Rev**, v. 70, n. 1, p. 3-21, 2012.

POUTAHIDIS, T. et al. Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

POWER, M. L.; SCHULKIN, J. Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. **Appl Transl Genom**, v. 130, p. 55–63, 2013.

PRUIS, M. G. M. et al. Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 1, p. 215-227, 2014.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics: their role in the management of gastrointestinal disorders in adults. **Nutr Clin Pract**, v. 27, n. 2, p. 195-200, 2012.

RAMAKRISHNA, B. S. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, sup. 4, p. 9–17, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY G. C. J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RODRIGUES, R. et al. Goat milk fat naturally enriched with conjugated linoleic acid increased lipoproteins and reduced triacylglycerol in rats. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3820-3831, 2014.

RUMBO, M.; SHINFRIN, E. J. Ontogeny of intestinal epithelium immune functions: developmental and environmental regulation. **Cell Mol Life Sci.**, v. 62, n. 12, p. 1288–1296, 2005.

SANTMARTÍN, B.; DIAZ, O.; TURIENZO, R. Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. **Small Ruminant Res**, 105, p.186-192, 2012.

SAVINO, F. et al. Faecal microbiota in breast-fed infants after antibiotic therapy. **Acta Paediatrica**, v. 100, n. 1, p. 75-78, 2011.

SCOTT, K. P. et al. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 52-60, 2013.

SEN, S.; SIMMONS, R. A. Maternal Antioxidant Supplementation Prevents Adiposity in the Offspring of Western Diet–Fed Rats. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3058-65, 2010.

SHERTZER, H. G. et al. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. **J Nutr**, v. 141, n. 4, p. 582-587, abr. 2011.

SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Res Int**, v. 53, n. 2, p. 882-890, 2013.

SPRONG, R. C.; SCHONEWILLE, A. J.; VAN-DER, M. R. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: Role of mucin and microbiota. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 4, p. 1364–1371, 2010.

THUM, C. et al. Prenatal caprine milk oligosaccharide consumption affects the development of mice offspring. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 4, 2016.

TORMO-BADIA, N. et al. Antibiotic Treatment of Pregnant Non-Obese Diabetic Mice Leads to Altered Gut Microbiota and Intestinal Immunological Changes in the Offspring. **Scand J Immunol**, v. 80, n. 4, p. 250-260, set. 2014.

TRANBERG, B. et al. Whey Protein Reduces Early Life Weight Gain in Mice Fed a High-Fat Diet. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, p. 480-485, 2009.

VAISHAMPAYAN, P. A. et al. Comparative Metagenomics and Population Dynamics of the Gut Microbiota in Mother and Infant. **Genome Biol Evol**, v. 2, p. 53-66, 2010.

VORSTER, H. H.; KRUGER, A.; MARGETTS, B. M. The nutrition transition in Africa: can it be steered into a more positive direction?. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 429-441, 2011.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, p. 1111-9, 2005.

WU, G. D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, p. 105-108, 2011.

YOSHIOKA, H., ISEKI, K., FUJITA, K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v. 72, n. 3, p. 317-21, 1983.

ZHOU, X. et al. A Model of Metabolic Syndrome and Related Diseases with Intestinal Endotoxemia in Rats Fed a High Fat and High Sucrose Diet. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-22, 2014.

APÊNDICE A

Artigo original submetido ao periódico “**Clinical Nutrition**”

POTENCIAL PREBIÓTICO DO SORO DE LEITE CAPRINO SUPLEMENTADO A RATAS E FILHOTES ALIMENTADOS COM DIETA OCIDENTALIZADA

Barbara Costa Paulino^a, Evandro Leite de Souza^b, Jessica Alencar de Sousa Gomes^c, Priscilla Paulo Lins^c, Tamires Alcoforado Sena de Lima^c, Jailane de Souza Aquino^c, Elizabeth do Nascimento^{a,1}

Short title: Prebiotic power goat milk in pups fed western-style diet

^a Laboratório de Bioquímica da Nutrição, Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil. E-mail: nlizbeth@gmail.com; elizabeth.nascimento2@ufpe.br

^b Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

^c Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa-PB, Brasil.

RESUMO

O consumo de dieta hiperlipídica ou ocidentalizada tem sido associado à alteração na microbiota e distúrbios fisiometabólicos, e a investigação de produtos que modifiquem esta relação demonstra relevância. Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial prebiótico do soro de leite de cabra em ratas alimentadas com dieta ocidentalizada desde a gestação e lactação, e seus descendentes ao final do desmame e aos 45 dias de vida. Foram utilizados oito machos e vinte e quatro fêmeas da linhagem *Wistar* para o acasalamento dos animais. Ao identificar a prenhez, as ratas foram randomizadas em quatro grupos experimentais: Grupo controle (CSAL), Grupo controle suplementado com soro (CSORO), grupo ocidentalizado (OSAL) ou grupo ocidentalizado suplementado com soro (OSORO). E, ao nascimento da prole, dois subgrupos foram formados conservando o mesmo tratamento utilizado pelas mães. Avaliou-se peso corporal, consumo alimentar, histologia intestinal e contagem de micro-organismos feccais nas ratas e seus descendentes. Não houve alteração no peso corporal das ratas na gestação ou lactação, mas a prole das ratas suplementadas com soro de leite apresentou redução do peso corporal ao desmame ($p<0,05$). Após-desmame os grupos suplementados com soro de leite de cabra, reduziram o ganho de peso corporal, bem como, a gordura visceral no grupo OSORO. A suplementação com soro de leite de cabra aumentou os a contagem de

¹ Corresponding author

Rua Professor Morais Rego, 1235. Cidade Universitária. Recife-PE- Brasil. CEP: 50670-901
Email: nlizbeth@gmail.com; elizabeth.nascimento2@ufpe.br (Nascimento, E.)

lactobacilos em ratas e filhotes e minimizou os impactos causados pela dieta ocidentalizada nas células epiteliais intestinais. Sugere-se que o soro de leite associado à dieta ocidentalizada teve potencial efeito na microbiota fecal, morfologia intestinal e na redução de ganho de peso e gordura visceral, e, parece ser dependente do período e da extensão da suplementação.

Palavras-chave: Dieta ocidentalizada. Estado nutricional. Microbiota fecal. Intestino delgado. Soro de leite de cabra.

Abreviações

ANOVA	Análise da Variância
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSAL	Dieta Controle e gavagem com solução salina
CSORO	Dieta Controle Suplementado com Soro do Leite de Cabra
IMC	Índice de Massa Corporal
OSAL	Dieta Ocidentalizada e gavagem com solução salina
OSORO	Dieta Ocidentalizada Suplementado com Soro do Leite de Cabra
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VET	Valor Energético Total

INTRODUÇÃO

A dieta ocidentalizada é caracterizada pelo excesso de lipídios, carboidratos simples e sódio, bem como pela escassez de fibras alimentares, além da presença de alimentos industrializados [1]. Experimentalmente, seu consumo tem sido associado a distúrbios metabólicos, como doença hepática gordurosa não alcoólica [2].

A ingestão desse tipo de dieta durante o período gestacional e lactacional predispõe a prole ao aumento do percentual de gordura corporal, bem como a incidência da síndrome metabólica [3], visto que estes períodos são considerados críticos e mais vulneráveis a influências ambientais, repercutindo no desenvolvimento a curto e longo prazo [4].

Dietas ricas em gordura, sobretudo saturadas, parecem promover alterações no percentual de gordura corporal e na morfologia intestinal, promovendo um desgaste das vilosidades intestinais [5], e, em longo prazo, alteração da microbiota intestinal. Por outro lado, a microbiota intestinal pode ser alterada por meio do consumo de micro-organismos

vivos com potencial probiótico e por compostos não digeríveis por enzimas do intestino delgado. Estes compostos podem ser degradados no intestino grosso e promoverem o crescimento e atividade de micro-organismos benéficos como os lactobacilos e as bifidobactérias, atuando como prebióticos [6].

Alguns nutrientes como os oligossacarídeos que compõem o leite materno são considerados prebióticos, pois parecem estimular o crescimento de bifidobactérias a nível intestinal [7]. De modo semelhante, parece atuar o leite de cabra, que possui um perfil de oligossacarídeos similar ao leite materno, e, em quantidades superiores [8].

Dietas ocidentalizadas também têm sido associadas a alterações na microbiota intestinal [9]. Por outro lado, supõe-se que esses efeitos possam ser minimizados pelo uso de compostos com potencial probiótico e prebiótico. Previamente foi observado que o soro do leite de vaca aumentou a quantidade de lactobacilos e bifidobactérias nas fezes de ratos alimentados com dieta ocidentalizada [10]. Estudos que investiguem o potencial benéfico do soro de leite são importantes, pois o soro é um resíduo proveniente da indústria do processamento de queijos e necessita de um destino sustentável na cadeia produtiva [11]. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial prebiótico da suplementação do soro do leite caprino sobre o estado nutricional, a microbiota fecal e a morfologia intestinal de ratas e de seus filhotes alimentados com dieta ocidentalizada desde a gestação e lactação até o final da fase maior crescimento dos filhotes.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do soro do leite de cabra

O leite de cabra utilizado no experimento foi obtido do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus de Bananeiras - PB, Brasil. As amostras de leite foram coletadas em cinco dias consecutivos, através de ordenha manual realizadas às 6:00 e às 14:00 horas em sala apropriada. A partir do processamento deste leite foi obtido o soro tipo doce, garantindo o controle de sua origem como resíduo da fabricação de queijos de coalho. Aproximadamente 7L de soro foram inicialmente desnatados e filtrados em tripla camada de gaze para remoção de contaminantes grosseiros. Em seguida, foram congelados a -22°C e liofilizados sob pressão de vácuo de 150µHg e temperatura de -47°C durante 24h em liofilizador L101 Liotop® (São Carlos – SP, Brasil) [11].

Após o processo de liofilização, o soro do leite foi analisado em triplicata, quanto ao percentual de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e lactose [12], e caracterizado conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do soro do leite de cabra liofilizado utilizado no experimento.

Parâmetros	Média ± SD
Proteína (%)	15,78 ± 0,52
Carboidratos (%)	
Lactose (%)	9,95 ± 0,37
Outros	N.d
Lipídio (%)	11,40 ± 0,74
Umidade (%)	4,14 ± 0,02
Cinzas (%)	6,88 ± 0,70
VET (Kcal)	205,52

*N.D= Não determinado

O soro liofilizado foi submetido à análise microbiológica quanto aos Coliformes totais e fecais, Estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, para garantir a ausência de contaminantes [13]. Também foram realizadas análises quanto aos *Lactobacillus*, Bacteroides, *Bifidobacterium* e Enterobactérias. Todos os micro-organismos investigados mostraram-se ausentes.

Animais e tratamentos

Os animais utilizados no presente estudo receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental e foram mantidos em condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas, iniciando o ciclo claro às 6hs), em temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 65%. Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram realizados somente após análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (processo nº 23076.044893/2014-21) e seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com o guia U.K. Animals Act (1986).

Foram utilizados 8 machos e 24 fêmeas (220-240g) da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE, para realizar o acasalamento na proporção de 1 macho: 3 fêmeas. Após a detecção da prenhez, por

meio do esfregaço vaginal, as ratas foram randomizadas em quatro grupos durante o período de gestação (± 23 dias), de acordo com a dieta ofertada (Tabela 2) [14], e a suplementação ou não com soro: dieta controle AIN-93G e gavagem com solução salina (CSAL, n=6), dieta controle AIN-93G e suplementação com soro do leite de cabra (CSORO, n=6) dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina (OSAL, n=5); dieta ocidentalizada e suplementação com soro do leite de cabra (OSORO, n=6).

Tabela 2 - Composição química e energética das dietas controle e ocidentalizada consumidas pelas ratas e seus filhotes durante o experimento.

Composição química	Dieta controle	Dieta ocidentalizada
Carboidratos (g/100 g), dos quais:		
Carboidratos simples	59,9	49,6
Carboidratos complexos	10,0	23,0
Fibras	44,0	22,0
5,0		4,6
Lipídios (g/100g), dos quais:	7,2	19,0
Saturados (%)	26,0	67,6
Monoinsaturados (%)	12,4	16,5
Poli-insaturados (%)	61,6	15,9
Proteínas (g/100 g)	17,0	22,0
Umidade e substâncias voláteis	9,5	4,2
Cinzas (g/100g)	6,0	5,2
Energia total (kcal/100 g)	3,6	4,1
% kcal VET		
Proteína	19,0	21,0
Carboidrato	63,0	42,0
Lipídio	18,0	37,0

Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos da UFPE (LEAAL).

Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem, e, como critério de seleção, apenas os que possuíam acima de 6g no primeiro dia pós-parto foram incluídos no estudo. Posteriormente, foram selecionados, aleatoriamente, 18 filhotes machos de cada grupo experimental, totalizando 72 filhotes. Posteriormente, 8 animais de cada grupo foram eutanasiados ao desmame, correspondendo a primeira fase do experimento. Os demais animais seguiram até os 45 dias de vida, o que corresponde à segunda fase do experimento e permaneceram se alimentando da mesma dieta utilizada pela mãe na gestação e lactação. Os grupos randomizados para a primeira fase do experimento (29 total) foram denominados de CSALp (n=8), CSOROp (n=7), OSALp, (n=8) e OSOROp (n=8), e os grupos formados para a segunda fase do experimento (39 ao todo) foram denominados de CSALp2 (n=9), CSOROp2 (n=10), OSALp2 (n=10), OSOROp2 (n=10).

O soro de leite de cabra foi utilizado como suplementação para os animais formando os grupos controle (CSORO) e ocidentalizado (OSORO). O soro liofilizado (1g/kg de peso do animal) foi diluído em solução salina no volume de 0,1g/mL [15] e administrado, por meio de gavagem, a partir do dia de detecção da prenhez. Da mesma forma, foi realizada a gavagem nos grupos CSAL e OSAL com solução salina (0,9%), no volume de 10mL/Kg de peso corporal do animal.

Semanalmente, foi realizado o acompanhamento da evolução ponderal do peso corporal e do consumo alimentar das ratas e dos filhotes sempre no mesmo dia da semana e horário. Para obtenção da quantia de dieta consumida, pesou-se o rejeito da ração, e subtraiu-se da quantidade de ração ofertada.

Análise da microbiota fecal

Foram analisadas as fezes das ratas e dos filhotes da segunda etapa do experimento. Amostras de fezes das ratas foram coletadas entre o 19º e o 21º dia de lactação e as dos filhotes, na segunda etapa do experimento entre 40º e o 45º dia de experimento. As fezes foram utilizadas para contagem e identificação da microbiota fecal, sendo homogeneizadas em água peptonada (100 mg. mL⁻¹) e, em seguida, diluídas em série (cinco diluições). Alíquotas de 20µL das respectivas diluições foram inoculadas, pela técnica de inoculação por microgota, em placas de Petri, estéreis, contendo ágar para contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias (Plate Count Agar/Methods Standart Agar – PCA/MSA, Acumedia, EUA), *Lactobacillus* (ágar Man, Rogosa and Sharpe- MRS, Himedia, Índia), *Bifidobacterium* (ágar Bifidobacterium, Himedia, Índia), Enterobactérias (ágar MacConkey, Acumedia, EUA), *Bacteroides* spp. (ágar BBE, Acumedia, EUA).

As placas de cultura para bactérias aeróbias e anaeróbias foram incubadas conforme metodologia do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* [16]. Os *Lactobacillus* foram incubadas em anaerobiose em temperatura de 37°C durante 24-48 h, e os *Bifidobacterium* spp, foram incubados em anaerobiose (Permution, Curitiba/Brasil) em estufa a 37°C por 72h. As enterobactérias foram incubadas a 37°C/48h e os *Bacteroides* spp., foram incubados a 37°C/72h em jarras de anaerobiose (Permution, Curitiba/Brasil). Após a incubação, as colônias específicas cultivadas nos meios de cultura seletivos foram contadas e o número de micro-organismos viáveis foi transformado em Unidade Formadora de Colônia (UFC) por g de fezes (UFC⁻¹.g⁻¹). O cálculo da média e do desvio padrão foi realizado a partir dos valores de CFU g⁻¹ em log10.

Parâmetros murinométricos

Os animais foram anestesiados e antes da eutanásia, foram avaliados o peso, comprimento corporal (naso-anal), circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT) e calculado o índice de massa corporal (IMC) [17].

Eutanásia

Após o período experimental de cada fase do estudo, os animais foram submetidos a jejum por 12 horas e em seguida anestesiados por via intraperitoneal (i.p.), com 45 mg/kg de cloridrato de ketamina associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina.

Ao desmame, as ratas e oito filhotes de cada grupo foram eutanasiados por punção cardíaca. Os demais filhotes (dez filhotes de cada grupo experimental) foram eutanasiados nos 44 (± 1) dias após o nascimento.

Pesagem de tecidos e análise histológica do intestino

O tecido adiposo abdominal, fígado e intestino foram coletados e pesados para realizar a expressão do peso relativo destes. Para ratas e filhotes aos 45 dias, obteve-se o peso relativo em g/100g de peso corporal. Para os animais de 23 dias, obteve-se o peso relativo em g/10g de peso corporal. A porção intestinal do jejuno foi higienizada (NaCl a 0,9%) e acondicionada em solução fixadora de formol tamponado a 10%. Posteriormente o material foi incluído em parafina, cortados semisseriados com 5 μ m de espessura segundo um mesmo plano de corte transversal ao intestino de todos os animais. As lâminas processadas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE) e submetidas à análise em microscópio óptico (Motic BA 200), em objetivas crescentes e fotografadas utilizando-se a objetiva de 40x. Foi avaliada a presença de padrões inflamatórios intestinais, como, estase, migração de células, hemorragia, vasodilatação, necrose, preservação epitelial, além de hipertrofia e hiperplasia da camada muscular lisa [18].

Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos resultados. Para analisar as diferenças médias entre consumo alimentar e evolução ponderal

em função da dieta e suplementação com soro de leite de cabra, bem como, a interação entre dieta e soro em função do tempo em cada um dos parâmetros foi utilizado a Análise de Variância de duas vias de medidas repetidas (*Two-way repeated measures ANOVA*). Para análise do peso úmido de órgãos, IMC, ganho de peso, foi utilizado ANOVA de uma via (*one way ANOVA*). Para o teste de comparações múltiplas entre os grupos foi usado o pós-teste de Bonferroni. Em todos os testes considerou-se a significância de 5 % ($p < 0,05$). A análise estatística e elaboração das figuras foi realizada no Programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para fins comparativos, o grupo ocidentalizado suplementado (OSORO) foi comparado ao seu par controle (OSAL) ou ao grupo salina equivalente (CSORO).

RESULTADOS

Acompanhamento de peso dos animais e consumo de dieta

O peso corporal médio das ratas ao início do estudo não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$), onde os grupos controles apresentaram $248,7 \pm 16,0$ g e os grupos com dieta ocidentalizada pesavam $248,8 \pm 14,4$ g. O ganho de peso durante a gestação (Figura 1A) e a variação de peso na lactação (Figura 1B) também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

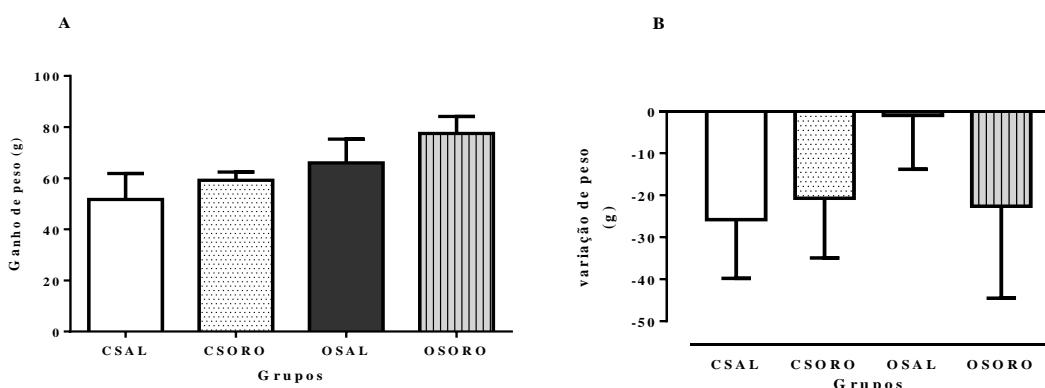


Figura 1 – Variação de peso corporal de ratas dos grupos que consumiram dieta controle (CSAL, n=6; CSORO, n=6) ou dieta ocidentalizada (OSAL, n=6; OSORO, n=6) durante o período gestacional (A) e lactacional (B). Dados expressos em média e desvio padrão da média (DP). Teste *one way ANOVA*. CSAL= ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO= ratas alimentadas com dieta controle e suplementadas com soro de leite de cabra; OSORO= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementadas com soro de leite de cabra.

Os filhotes da primeira etapa, oriundos de mães que consumiram dieta ocidentalizada, apresentaram maior peso corporal ($p<0,05$) ao final da lactação (Figura 2A), corroborado pelo maior percentual de ganho de peso (Figura 2B). Portanto, observa-se relevante interação no tempo [$F(9,87)=8,83$, $p<0,00$], pelo tratamento dietético [$F(3,87)=413,69$, $p<0,00$]; e pela interação entre a dieta e o tempo [$F(29,87)=3,13$, $p<0,00$]. Contudo, fica evidente que a ingestão de soro de leite de cabra, reduziu o peso em ambos os grupos na segunda etapa do experimento (Figura 2C), mostrando apenas diferenças intergrupo ($p<0,05$), ou seja, entre CSALp2 e OSALp2 e entre CSOROp2 e OSOROp2 (Figura 2D).

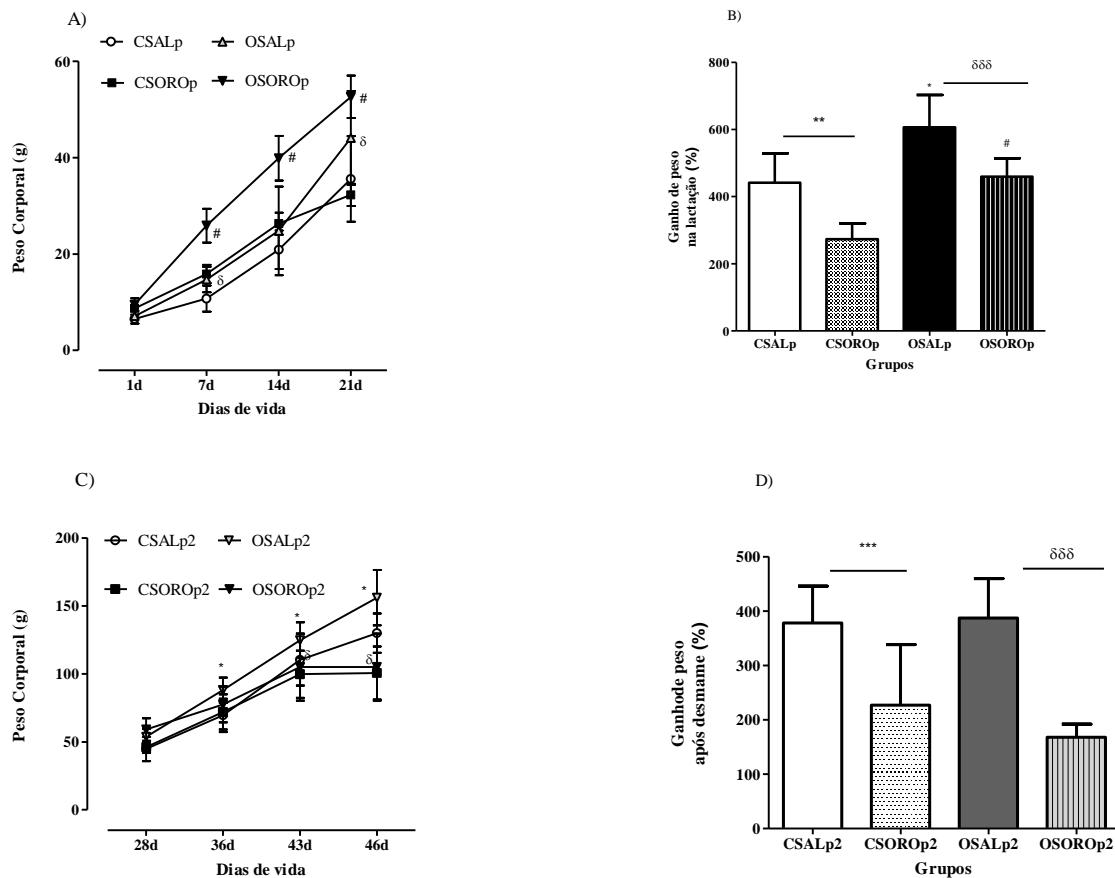


Figura 2 - Evolução ponderal do peso de filhotes durante a lactação (2A) e após o desmame (2C), percentual de ganho de peso na lactação (2B) e após o desmame (2D). Dados apresentados em média \pm DP. Teste *two way* RM ANOVA (A,C) e teste *one way* ANOVA (B,D) seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ vs CSAL; # $p<0,05$ vs CSORO; δ vs OSAL*** $p<0,001$.

O consumo alimentar durante a gestação (Figura 3) apresentou diferenças significativas apenas na segunda semana e, verificou-se que houve um efeito do tempo [$F(2,57)=4,71$, $p=0,01$] e do tratamento dietético dos grupos [$F(3,57)=13,62$, $p=0,00$], mas sem interação entre o tempo e o tratamento dietético [$F(6,57)=0,98$, $p=0,013$]. Durante a

lactação, observou-se um relevante efeito do tempo no consumo de alimento [$F(2,54)=9,20$], mas não do tratamento dietético dos grupos [$F(3,54)=0,26$, $p=0,086$], que não apresentaram diferença estatística entre si ($p>0,05$) (Figura 3). Apesar da diferença de 18% a mais de quilocalorias (kcal) na dieta ocidentalizada, o resultado do consumo energético não demonstrou diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

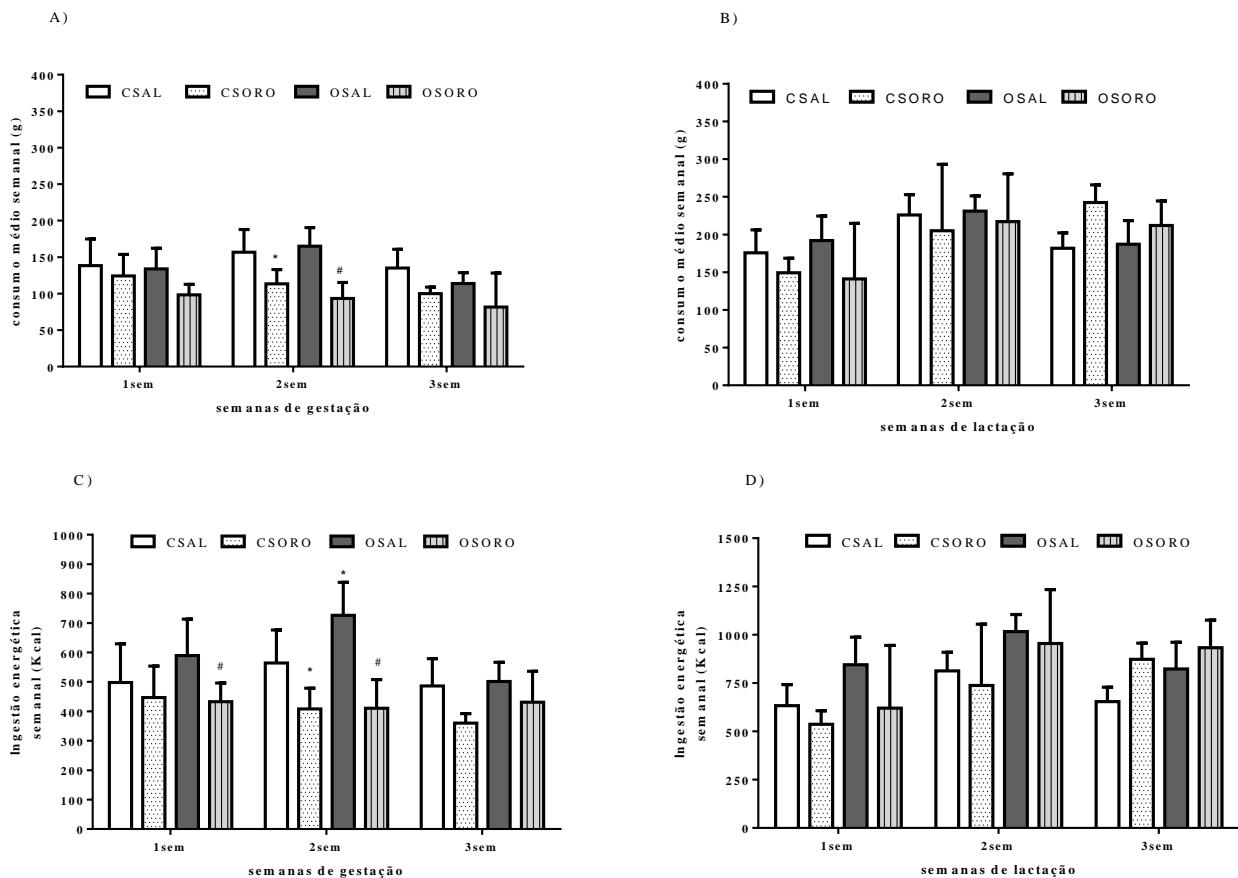


Figura 3 – Influência da dieta materna e da suplementação com soro de leite de cabra sobre a ingestão alimentar de ratas durante as semanas de gestação (A) e de lactação (B) e sobre o valor energético durante a gestação (C) e lactação (D). Dados expressos em média \pm DP, resultados obtidos a partir do Teste *two way* RM ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ vs CSAL; # $p<0,05$ vs OSAL. CSAL= ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO= ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra.

O consumo alimentar acumulado da prole após o desmame, demonstrou que a suplementação com soro de leite de cabra não modificou a ingestão nos grupos controles (CSALp2=192,8±26,4g; CSOROp2=196,7±21,7g), mas, alterou o consumo de dieta ocidentalizada, em que o grupo OSOROp2 apresentou uma ingestão maior que o OSALp2

(OSOROp2=187,9±6,5g; OSALp2=152,1±12,2g, p<0,05). Com relação ao consumo energético, o grupo OSOROp2 ingeriu maior quantidade de energia que o grupo OSALp2 e CSOROp2 (OSOROp2= 826,8±28,5kcal; OSALp2= 669,2±53,6kcal; CSOROp2= 727,7±80,4kcal; CSAL=713,3±97,5kcal, p<0,05).

Parâmetros murinométricos e peso de órgãos e tecidos

Os parâmetros murinométricos e peso de órgãos das ratas, avaliado ao final do período lactacional, foram semelhantes entre os grupos (p>0,05). Em relação aos filhotes da primeira etapa do experimento (23 dias), foi possível observar que os grupos alimentados com dieta ocidentalizada apresentaram maiores parâmetros de IMC, CT e CA (p<0,05), independente da suplementação com soro de leite de cabra, quando comparados aos respectivos grupos controles alimentados com dieta controle (Tabela 3). Quanto ao peso relativo dos órgãos, o tecido adiposo abdominal mostrou-se elevado no grupo OSALp comparado ao CSALp e no grupo OSOROp comparado ao CSOROp. Mas, nenhuma diferença foi observada no peso úmido relativo (g/100g) do fígado ou intestino (Tabela 3).

Na segunda etapa do experimento (45 dias), o grupo alimentado com dieta ocidentalizada e soro de leite de cabra, apresentou menor IMC e CT, sendo que o grupo OSALp2 apresentou IMC maior que os outros grupos do experimento (p<0,05). A CT também foi menor no CSOROp2 quando comparado a todos os grupos experimentais. Em relação ao peso relativo dos órgãos, foi verificado que a suplementação com soro de leite de cabra aumentou o peso do fígado em ambos os grupos suplementados independente da dieta consumida. O tecido adiposo abdominal apresentou-se maior nos animais do grupo OSALp2 comparado ao seu par controle CSALp2, mas sem diferenças nos grupos suplementados com soro de leite de cabra, sugerindo um efeito benéfico da suplementação. No intestino, o grupo OSOROp2 mostrou maior peso comparado ao CSOROp2 e ao OSALp2.

Tabela 3 - Parâmetros murinométricos e peso relativo dos órgãos de ratas, filhotes da 1^a etapa e 2^a etapa de experimento.

VARIÁVEIS		GRUPOS			
Ratas	CSAL (n=6)	CSORO (n=6)	OSAL (n=6)	OSORO (n=6)	Valor de p
Murinometria					
IMC	0,46±0,05	0,42±0,03	0,48±0,05	0,46±0,03	=0,10
CT	12,25±0,61	11,50±0,45	12,60±0,42	12,08±0,80	=0,06
CA	13,83±1,13	12,33±0,98	13,80±1,15	13,42±0,92	=0,08
Peso eutanásia	236,67±34,45	203,33±21,37	249,00±31,30	220,00±20,25	=0,06
Peso dos órgãos (g/100g de peso)					
Gordura abdominal	2,99±1,21	1,95±0,80	1,50±0,89	0,78±0,10*	<0,05
Fígado	3,66±0,45	3,79±0,57	3,38±0,36	3,72±0,43	=0,44
Intestino	4,76±0,62	3,92±0,75	4,77±0,71	4,73±0,54	=0,10
Filhotes 23d		CSALp (n=8)	CSOROp (n=7)	OSALp (n=8)	OSOROp (n=8)
Murinometria					
IMC	0,25±0,04	0,27±0,03	0,31±0,04*	0,29±0,04	<0,00
CT	7,56±0,68	7,07±0,53	8,55±0,50*	8,63±0,74 [#]	<0,00
CA	8,19±0,70	7,21±0,64	8,87±0,55	8,94±0,82 [#]	<0,00
Peso eutanásia	35,01±9,43	32,36±2,29	49,75±4,34*	51,50±6,63 [#]	<0,00
Peso dos órgãos (g/10g de peso)					
Gordura abdominal	0,04±0,01	0,05±0,01	0,12±0,03*	0,09±0,03 [#]	<0,00
Fígado	0,37±0,10	0,38±0,02	0,33±0,04	0,36±0,01	=0,38
Intestino	0,56±0,15	0,46±0,04	0,57±0,17	0,53±0,08	=0,40
Filhotes 45 d		CSALp₂ (n=9)	CSOROp₂ (n=10)	OSALp₂ (n=10)	OSOROp₂ (n=10)
Murinometria					
IMC	0,40±0,03	0,34±0,04	0,47±0,04 * ^δ	0,38±0,06	<0,00
CT	10,56±0,73	9,78±0,75 * ^δ	11,05±0,60	10,45±0,76	<0,00
CA	12,0±0,83	11,39±0,93	12,15±1,20	11,85±1,27	=0,47
Peso eutanásia	122,78±16,79	96,50±14,82 *	156,00±20,39*	120,50±24,55 ^δ	<0,00
Peso dos órgãos (g/100g de peso)					
Gordura abdominal	2,23±0,41	2,58±0,63	3,46±0,79*	3,23±1,05	<0,05
Fígado	3,77±0,32	4,90±0,96*	3,96±0,28	5,12±1,18 ^δ	<0,00
Intestino	4,57±0,74	5,47±1,25	5,35±0,67	7,66±1,33 ^δ	<0,00

Dados expressos em média±DP, resultados obtidos a partir do Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs CSAL; [#] p<0,05 vs CSORO; ^δ p<0,05 vs OSAL; ^δ vs OSORO.

Microbiota fecal

A suplementação de soro de leite de cabras nas ratas durante a gestação e lactação (Figura 4A), não modificou a contagem do gênero *Lactobacillus* na avaliação intragrupo, nem nos controles, ($CSAL=6,43\pm0,35$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO=6,94\pm0,49$ log.UFC/g⁻¹) nem entre os grupos com dieta ocidentalizada ($OSAL=7,34\pm0,09$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,78\pm0,35$ log.UFC/g⁻¹). Porém, os grupos com a dieta suplementada com soro apresentaram maior contagem de *Lactobacillus* do que seus pares ($OSAL=7,34\pm0,08$ log.UFC/g⁻¹; $CSAL=6,43\pm0,31$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,79\pm0,30$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO=6,94\pm0,45$ log.UFC/g⁻¹). Para o grupo das bactérias anaeróbias, a suplementação com soro de leite de cabra diminuiu a contagem desses micro-organismos tanto no grupo controle ($CSAL=7,58\pm0,37$ log.UFC/g⁻¹; $CSORO=6,94\pm0,29$ log.UFC/g⁻¹) quanto no grupo ocidentalizado ($OSAL=8,08\pm0,06$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,02\pm0,23$ log.UFC/g⁻¹). Quanto ao gênero das bifidobactérias e anaeróbias totais, não foram observadas nas ratas nenhuma diferença decorrente dos tratamentos utilizados.

Nos filhotes (Figura 4B) não foram verificadas diferenças estatísticas ($p<0,05$), com exceção do gênero *Lactobacillus* que estavam mais elevados nos grupos suplementados com soro comparados aos seus pares ($CSALp_2=6,31\pm0,57$ log.UFC/g⁻¹; $CSOROp_2=7,30\pm0,11$ log.UFC/g⁻¹; $OSALp_2=6,66\pm0,14$ log.UFC/g⁻¹; $OSOROp_2=7,40\pm0,29$ log.UFC/g⁻¹), conforme exposto na Figura 4. Nos filhotes aos 45 dias, pode-se observar que o grupo OSALp₂ mostrou menor contagem das enterobactérias de aproximadamente 0,92 ciclo logarítmico comparado ao grupo CSALp₂ e OSOROp₂ ($OSALp_2=6,85\pm0,26$ log.UFC/g⁻¹; $CSALp_2=7,77\pm0,35$ log.UFC/g⁻¹; $OSOROp_2=7,76\pm0,41$ log.UFC/g⁻¹). Na classe de bacteroides, a contagem no grupo OSALp₂ também foi menor que o grupo OSOROp₂ na ordem de 0,12 ciclos logarítmicos ($OSAL=7,15\pm0,1210$ log.UFC/g⁻¹; $OSORO=7,62\pm0,10$ log.UFC/g⁻¹).

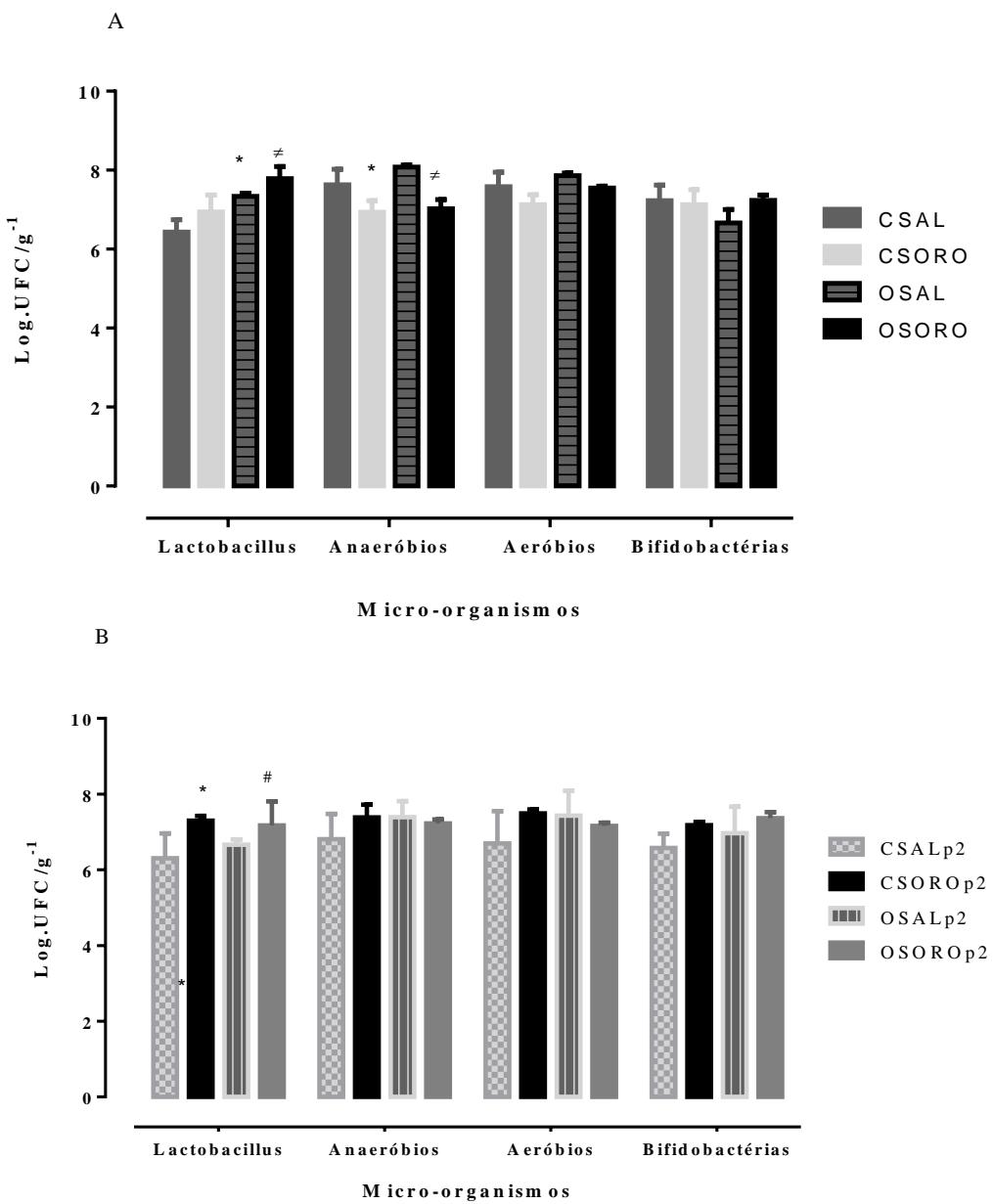


Figura 4 – Médias das populações de micro-organismos nas amostras de fezes cultivados em aerobiose (Bactérias aeróbias) e anaerobiose (*Lactobacillus*, *Bifidobactérias* e *Anaeróbios*), de ratas (A) e de filhotes (B) alimentados com dietas controle ou ocidentalizada, e, tratados com solução salina ou soro de leite de cabra. Teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Dados expressos em Log10 do número de unidades formadoras de colônia/mL) CSAL= ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO= ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra.*p<0,05 vs CSAL e #vs CSORO

Análise histológica do intestino

A avaliação morfológica foi realizada por meio da análise histológica das células intestinais, especificamente no jejuno (Figura 5A). Foi possível observar, que as ratas alimentadas com dieta ocidentalizada (OSAL) apresentaram desgaste epitelial, destruição (triângulo) e necrose (seta) das vilosidades, além de hemorragia central com perda da arquitetura tecidual (Figura 5A). Nos grupos controles (CSAL e CSORO) não se detectou alterações (Figura 5A). Porém, nas ratas que consumiram a dieta ocidentalizada e suplementação de soro de leite (OSORO), houve a ausência do processo inflamatório assemelhando-se aos animais do grupo controle (Figura 5A).

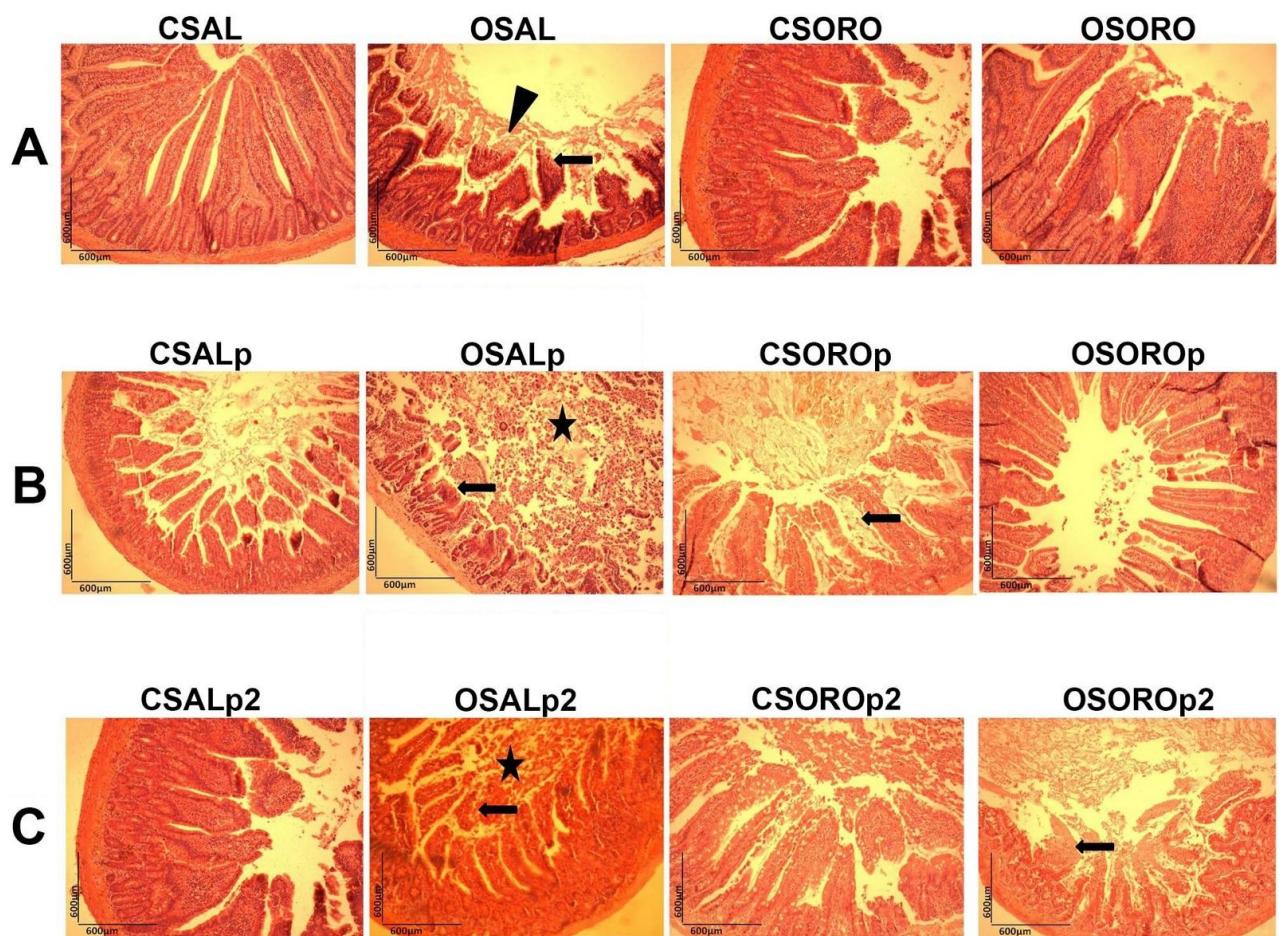


Figura 5 – Histologia do jejuno de ratas (A), filhotes aos 23 dias (B) e filhotes aos 45 dias (C). Imagem de microscopia com aumento de 100x. CSAL: ratas alimentadas com dieta controle e gavagem com solução salina; OSAL= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e gavagem com solução salina; CSORO= ratas alimentadas com dieta controle e suplementação com soro de leite de cabra; OSORO= ratas alimentadas com dieta ocidentalizada e suplementação com soro de leite de cabra. As siglas dos filhotes aos 23 dias são acrescidas da letra p e as 45 dias, são acrescidas da letra p2. Seta: destruição epitelial. Estrela: exsudato inflamatório. Triângulo: necrose.

Resultados semelhantes foram encontrados na prole aos 23 dias de vida (Figura 5B), em que o grupo OSALp apresentou processo inflamatório (estrela) e destruição epitelial (seta) exibindo melhora no grupo OSOROp. Contudo, observou-se que nos filhotes alimentados com dieta ocidentalizada por maior período de tempo, ocorreu um agravo do desgaste epitelial e da destruição das vilosidades. Entretanto, a suplementação com soro de leite de cabra (CSOROp2 e OSOROp2), também minimizou estes impactos adversos e não se observou processo inflamatório (Figura 5C).

DISCUSSÃO

A oferta da dieta ocidentalizada e de soro de leite de cabra a mães e a prole jovem, influenciou diversos parâmetros elegíveis. Nas ratas, as alterações de peso, murinometria e consumo alimentar foram influenciados pelos tratamentos. Contudo, foi observado nos filhotes do grupo ocidentalizado, um aumento das medidas murinométricas e do peso corporal durante a lactação. A continuidade da suplementação em filhotes até o final da infância promove redução do ganho de peso e medidas murinométricas em ambos os grupos suplementados.

Os resultados de peso e consumo detectados nas mães e filhotes corroboram os resultados observados por pesquisadores que utilizaram dieta semelhante [19]. Um menor ganho de peso também foi observado em filhotes alimentados com proteína oriunda de soro de leite de vaca quando comparado ao grupo alimentado com proteína caseína [20]. Os resultados convergem para supormos que a fonte proteica pode interferir sobre o ganho de peso corporal. A diferente composição aminoacídica das fontes proteicas pode estar envolvida na colonização da microbiota intestinal.

A suplementação de ratos com solução bacteriana de *Lactobacillus plantarum* comparada a outros tipos de suplementos bacterianos também reduziu o ganho de peso e a gordura corporal [21]. Outro estudo conduzido com a suplementação de *Lactobacillus reuteri* (presente no iogurte) observou semelhante perfil com a redução de ganho de peso em camundongos alimentados que se alimentaram com dieta ocidentalizada [9]. Vale salientar que neste estudo foi detectado um maior número de *Lactobacillus* na prole suplementada comparada aos seus pares não suplementados. O conjunto de resultados sugere que a dieta e/ou o alimento/nutriente parece interferir na colonização microbiana e que esta por sua vez influencia notavelmente o ganho de peso corporal provavelmente por mecanismos associados à síntese de hormônios envolvidos na homeostase energética e armazenamento de gordura

corporal [22].

Porém, mais que o peso corporal total, a gordura da região abdominal/visceral é considerada uma das mais deletérias para o surgimento de distúrbios metabólicos. Nossos resultados demonstram que a dieta ocidentalizada promoveu maior depósito de gordura abdominal nos filhotes aos 23 dias de idade. Porém, a continuidade da prole ingerindo dieta ocidentalizada associada à suplementação do soro aboliu a significância encontrada aos 23 dias no grupo que consumiu dieta ocidentalizada e soro, mas no grupo não suplementado com soro caprino a magnitude de diferença da gordura corporal atingiu 55% a mais no OSALp2 comparado ao CSALp2. O efeito da dieta ocidentalizada sobre o aumento da quantidade de gordura abdominal em filhotes corrobora resultados observados em estudos prévios [9,23, 24] e parece que a suplementação com micro-organismos como o *Lactobacillus reuteri* durante 8 semanas, reduz a quantidade de gordura na região visceral [9]. O aumento na gordura visceral observado precocemente manteve-se nos filhotes aos 45 dias, mas, se observa ausência de significância no grupo suplementado com soro sugerindo um efeito positivo da suplementação nesse grupo. Porém, o período de suplementação pode interferir nesta resposta visto que não encontramos aumento de gordura visceral no grupo controle suplementado com soro, mas, estudo recente demonstrou que esta foi maior em filhotes do grupo controle suplementado com oligossacarídeos de soro de leite de cabra quando a suplementação ocorreu apenas durante a gestação [25].

No presente estudo, o maior peso encontrado no fígado pode ter sido decorrente da suplementação com soro de leite de cabra e não pela ingestão da dieta ocidentalizada, tendo em vista que em outros estudos [23,24] não foi observado aumento do peso deste órgão em animais que consumiram dieta ocidentalizada durante o período perinatal. Porém, foi observado esteatose hepática em ratos alimentados com leite de cabra rico em ácido linoleico conjugado [26]. Como não foi objetivo do estudo investigar a histologia hepática, suspeitamos que alguma injúria hepática possa ter sido desenvolvida.

Na microbiota e morfologia intestinal, evidente efeito da dieta ocidentalizada foi observado em todos os grupos. A dieta é uma moduladora da microbiota, onde a ocidentalizada é conhecida por aumentar as bactérias do filo *Firmicutes*, que se mostram mais associadas a prejuízos à saúde humana [27]. Nossos resultados mostram que a suplementação com o soro aumenta o número de lactobacilos totais tanto nas ratas como nos filhotes. Ratos alimentados com dieta ocidentalizada acrescida de soro de leite aumentaram respectivamente, a quantidade de *Lactobacillus* totais e *Bifidobactérias* [10]. Igualmente, o uso da fração isolada de oligossacarídeos do soro de leite de cabra causou aumento tanto da fração de

Lactobacillus quanto de bifidobactérias em ratos [28]. Os oligossacarídeos são encontrados em maiores concentrações no leite de cabra que no leite bovino, mostrando maiores semelhanças aos oligossacarídeos do leite humano e potencial efeito na redução do processo inflamatório [8] comum em indivíduos alimentados com dietas obesogênicas que promovem o aumento da gordura corporal.

Apesar da contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias totais ter se mostrado inalterada, observamos que nos filhotes aos 45 dias a quantidade de Enterobactérias e *Bacteroides* do grupo ocidentalizado suplementado com soro aumentaram quando comparadas aos seus pares. A redução de bactérias aeróbias e anaeróbias também foi encontrada em humanos com obesidade [29], o que denota relação entre a abundância desses micro-organismos no microbioma e a ocorrência da obesidade.

Previvamente foi demonstrado que a ingestão de dieta ocidentalizada (elevada em gordura e carboidratos simples) alterou a morfologia intestinal com lesões intestinais e infiltrado de células inflamatórias observada em ratas e filhotes [5]. Nossos resultados demonstram que a adição de soro de leite de cabra minimizou os impactos causados pelo consumo de dieta ocidentalizada. Parte desse efeito pode ser atribuída à presença de oligossacarídeos no soro de leite de cabra (potencial prebiótico) que atua como agente anti-inflamatório na doença inflamatória intestinal [7,10]. De modo semelhante, outro estudo [30] demonstrou que ratos desnutridos que receberam um composto contendo probióticos e prebióticos apresentaram uma melhora nos parâmetros relacionados à morfometria do intestino delgado, como a restauração das vilosidades e criptas intestinais.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e algumas evidências da literatura sugerimos que o soro de leite de cabra durante gestação e lactação mostrou impactos positivos sobre aspectos histológicos, inflamatórios e na microbiota das ratas. Nos filhotes as mudanças variaram tanto em função da dieta quanto da idade investigada. Contudo, foram evidentes os benefícios na morfologia intestinal, microbiota fecal, modulação de peso corporal e gordura abdominal. Entretanto, mais estudos são necessários para definir a dose-efeito, o tempo e a eficácia do tratamento. Em adição, análises complementares a exemplo da histologia hepática e outras dosagens enzimáticas e moleculares, bem como, estratificação de uma maior quantidade de micro-organismos avaliados são estudos desejáveis.

Fontes de financiamento

Agradecemos o financiamento do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)/Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por meio do projeto Casadinho PROCAD/CNPq (PROCESSO: 552098/2011-6).

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- [1] Popkin B. The Nutrition Transition in the Developing World. *J. Nutr.* 2001;131(3): 871S-873S.
- [2] Sellmann C, Priebs J, Landmann M, Degen C, Engstler A, Jin C et al. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem.* 2015;26(11):1183-1192.
- [3] Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist J, Ronis M, Badger T. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol.* 2007; 294(2):R528-R538.
- [4] Power M, Schulkin J. Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. *Appl Transl Genomics.* 2013; 2:55-63.
- [5] Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C et al. A Model of Metabolic Syndrome and Related Diseases with Intestinal Endotoxemia in Rats Fed a High Fat and High Sucrose Diet. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e115148.
- [6] Quigley E. Prebiotics and Probiotics: Their Role in the Management of Gastrointestinal Disorders in Adults. *Nutr Clin Pract.* 2011;27(2):195-200.
- [7] Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martínez-Ferez A, Guadix E, Medina F S, et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten induced colitis. *J Nutr.* 2006; 136 (3): 672-76.
- [8] Martinez-Ferez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel C, Pohlentz G, Boza J et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int Dairy J.* 2006;16(2):173-181.
- [9] Poutahidis T, Kleinewietfeld M, Smillie C, Levkovich T, Perrotta A, Bhela S et al. Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e68596.

[10] Sprong R, Schonewille A, van der Meer R. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: Role of mucin and microbiota. *J Dairy Sci.* 2010;93(4):1364-1371.

[11] Sanmartín B, Díaz O, Rodríguez-Turienzo L, Cobos A. Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Res.* 2012;105(1-3):186-192.

[12] Association of Official Agricultural Chemistry (AOAC). Official methods of analysis the of Association of Analytical Chemists International. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005.

[13] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.

[14] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GCJ. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-51.

[15] Afuape A, Turner M, Strobel S. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):40-48.

[16] APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.

[17] Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-119.

[18] Kim K, Ong J, Okuno O. The effect of filler loading and morphology on the mechanical properties of contemporary composites. *J Prosthet Dent.* 2002;87(6):642-649.

[19] Ferro Cavalcante T, Lima da Silva J, da Marcelino da Silva A, Muniz G, da Luz Neto L, Lopes de Souza S et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. *Lipids.* 2013;48(11):1157-1168.

[20] Tranberg B, Hellgren L, Lykkesfeldt J, Sejrsen K, Jeamet A, Rune I et al. Whey Protein Reduces Early Life Weight Gain in Mice Fed a High-Fat Diet. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71439.

[21] Karlsson C, Molin G, Fåk F, Johansson Hagslätt M, Jakesevic M, Håkansson Å et al. Effects on weight gain and gut microbiota in rats given bacterial supplements and a high-energy-dense diet from fetal life through to 6 months of age. *Br J Nutr.* 2011;106(06):887-895.

[22] Vrieze A, Holleman F, Zoetendal E, De Vos W, Hoekstra J, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Obes metabol.* 2010;(4):52.

[23] Ferro Cavalcante T, Marcelino da Silva A, Lira M, Amaral Almeida L, Marques A, Nascimento E. Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(8):989-993.

[24] Bautista C, Montaño S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz P, Bobadilla N et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2015;115(03):538-546.

[25] Thum C, McNabb W, Young W, Cookson A, Roy N. Prenatal caprine milk oligosaccharide consumption affects the development of mice offspring. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60 (4): 1-10.

[26] Rodrigues R, Soares J, Garcia H, Nascimento C, Medeiros M, Bomfim M et al. Goat Milk Fat Naturally Enriched with Conjugated Linoleic Acid Increased Lipoproteins and Reduced Triacylglycerol in Rats. *Molecules.* 2014;19(3):3820-3831.

[27] Ley R, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone C, Knight R, Gordon J. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-11075.

[28] Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Gálvez J, López-Huertas E et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr.* 2006;25(3):477-488.

[29] Turnbaugh P, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel B, Duncan A, Ley R et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2008;457(7228):480-484.

[30] Ben M, Bekada A, Idris K, Kheroua O. Probiotic oligosaccharides improve the recovery of intestinal mucosa and biochemicals parameters in malnourished rats. *Int J Nutr Metabol.* 2014;6(2):28-36.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais do CCB/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de abril de 2015.

Ofício nº 35/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Profª Elizabeth do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.044893/2014-21

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Consequência do uso de soro de leite de cabra sobre parâmetros bioquímicos, morfologia e microbiota intestinal de ratas e filhotes jovens alimentados com dieta ocidentalizada desde a vida perinatal.”**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: Acima de 90 dias; Sexo: machos e fêmeas; Número total de animais: 44.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA/CCB-UFPE
SIAPe 1801584

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo ao periódico “Clinical Nutrition”

Your recent submission to YCLNU

sex 30/09/2016 13:25

Para:barbaracpaulino@hotmail.com <barbaracpaulino@hotmail.com>;

Dear Dr. Barbara Costa Paulino,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Clinical Nutrition

Corresponding Author: Elizabeth Nascimento

Co-Authors: Barbara Costa Paulino, Master in nutrition; Evandro Leite de Souza, PhD; Jessica Alencar de Sousa Gomes, Nutritionist; Priscilla Paulo Lins, nutrition's student; Tamires Alcoforado Sena de Lima, Nutritionist; Jailane de Souza Aquino, PhD;

Title: Potential prebiotic effects of goat milk whey supplementation in female rats and offspring fed with westernized diet

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at nlizbeth@gmail.com; santana.giselia@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/yclnu/l.asp?i=128122&l=9TPO2J6Z>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Clinical Nutrition