

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

THAÍS COSTA DE ALMEIDA

Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal

**Juiz de Fora - MG
2024**

THAÍS COSTA DE ALMEIDA

Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com concentração em Imunologia e DIP.

Orientadora: Professora Doutora Alessandra Barbosa Ferreira Machado

**Co-orientadoras: Professora Doutora Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti
Professora Doutora Julliane Dutra Medeiros
Professora Doutora Vânia Lúcia da Silva**

**Juiz de Fora - MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Thaís Costa de.

Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal / Thaís Costa de Almeida.

-- 2024.

81 f.

Orientadora: Alessandra Barbosa Ferreira Machado

Coorientadoras: Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti, Julliane Dutra Medeiros

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Programação metabólica. 2. Lactação. 3. Probióticos. 4. Kefir. I. Machado, Alessandra Barbosa Ferreira, orient. II. Luquetti, Sheila Cristina Potente Dutra, coorient. III. Medeiros, Julliane Dutra, coorient. IV. Título.

Thaís Costa de Almeida

Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunologia e DIP.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Alessandra Barbosa Ferreira Machado - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof.^a Dr.^a. Lisiane Lopes da Conceição

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof.^a Dr.^a. Yasmin Neves Vieira Sabino

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

THAÍS COSTA DE ALMEIDA

Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal

Dissertação
apresentada
ao Programa de Pós-
graduação em
Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia & DIP.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Alessandra Barbosa Ferreira Machado - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Professora Doutora Lisiane Lopes da Conceição

Universidade Federal de Uberlândia

Professora Doutora Yasmin Neves Vieira Sabino

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 07/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Professor(a)**, em 28/02/2024, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com



fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yasmin Neves Vieira Sabino, Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lisiane Lopes da Conceição, Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1699191** e o código CRC **D05FFA9B**.

*Aos meus pais, que investiram na minha
educação com amor e dedicação incansáveis.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, expresso profunda gratidão por serem minha maior inspiração e por seu apoio incondicional ao longo desta jornada, permitindo-me dedicar aos estudos até alcançar este ponto.

À minha irmã, por ter sido uma fonte de apoio ao longo desta jornada. Seu encorajamento constante e presença amorosa foram elementos fundamentais para o meu sucesso, e sou grata por tê-la ao meu lado.

Ao Otávio, obrigada por nunca me deixar desistir. Sua presença, encorajamento e apoio incondicional foram a luz que iluminou os momentos desafiadores desta jornada. Obrigada por compartilhar comigo cada conquista.

Aos meus queridos amigos, que estiveram ao meu lado durante toda a minha jornada acadêmica. Obrigada por me apoiarem e compreenderem quando não pude estar presente.

À minha orientadora, Alessandra Barbosa Ferreira Machado. Seu apoio e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para o meu crescimento profissional. Obrigada por confiar em mim e por ser uma fonte constante de inspiração.

À minha co-orientadora, Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti, agradeço pelas oportunidades valiosas que surgiram desde a graduação, moldando meu percurso até a pós-graduação. Agradeço por toda a assistência dedicada ao longo desse período e, acima de tudo, pela confiança depositada em mim.

Às minhas co-orientadoras Julliane Dutra Medeiros e Vânia Lúcia da Silva, pelo valioso suporte e conhecimento que contribuíram significativamente para o sucesso deste trabalho.

À Poli e Gabi Alpino, obrigada por toda a ajuda e parceria desde o início dessa jornada.

Aos alunos e professores do CEMIC, por toda ajuda e contribuições que deram ao meu trabalho.

Aos técnicos do LIP, agradeço por toda assistência e prestatividade.

À banca examinadora, pelo aceite do convite.

Aos programas da CAPES e FAPEMIG pela oportunidade de desenvolvimento do meu projeto.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, pela oportunidade de especialização e de obtenção do título.

*“Temos de nos tornar a mudança que queremos ver”
- Mahatma Gandhi*

RESUMO

ALMEIDA, THAÍS COSTA. Efeitos do consumo de kefir de leite na lactação por ratas Wistar sobre a microbiota do leite materno, microbiota e saúde intestinal da prole superalimentada no período neonatal. 2024. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias) - Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2024.

Os fatores ambientais, quando presentes em períodos críticos do desenvolvimento, como a lactação, podem desempenhar um papel fundamental para a saúde durante a infância e/ou vida adulta, o que é chamado de “programação metabólica”. Nesse contexto, a ingestão de probióticos como o kefir de leite, neste período, pode resultar em efeitos benéficos na microbiota intestinal de recém-nascidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de kefir de leite por ratas Wistar durante a lactação sobre a microbiota do leite materno e a microbiota e saúde intestinal da progênie superalimentada no período neonatal. Aqui, ratas Wistar lactantes e seus filhotes foram divididos em quatro grupos: ninhada normal (NL), ninhada normal kefir (KNL), ninhada reduzida (SL) e ninhada reduzida kefir (KSL), dependendo do tamanho da ninhada (NL: 10 ou SL: 3) e o consumo de probiótico. Os ratos foram alimentados diariamente por gavagem com ração comercial + água (NL e SL) ou ração comercial + probióticos ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). O peso corporal dos filhotes foi avaliado diariamente, tendo os grupos superalimentados ganhado mais peso ao longo de 21 dias. O sequenciamento do gene 16S rRNA do leite materno revelou a predominância dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteriota e algumas diferenças nas abundâncias de gêneros bacterianos foram observadas entre grupos. O sequenciamento da microbiota intestinal da prole mostrou variação na diversidade beta e os filos Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria e Campylobacterota foram os mais abundantes. Algumas diferenças nas abundâncias de gêneros bacterianos da microbiota intestinal também foram observadas entre grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na análise morfométrica das criptas intestinais entre os grupos, bem como na análise da concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes da prole. Dessa forma, o consumo materno de kefir de leite durante a lactação teve

efeitos positivos na microbiota intestinal dos filhotes, principalmente nos filotes, e observou-se uma possível influência do tamanho da ninhada na microbiota do leite materno. No entanto, um aspecto a ser considerado é o curto período de 21 dias, o que indica a necessidade de realizar mais pesquisas para entender completamente os benefícios potenciais do kefir de leite na microbiota e na saúde intestinal.

Palavras-chave: programação metabólica; lactação; probióticos; kefir.

ABSTRACT

ALMEIDA, THAÍS COSTA. Effects of milk kefir consumption during lactation by Wistar rats on the microbiota of breast milk, microbiota and intestinal health of overfed offspring in the neonatal period. 2024. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias) - Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2024.

Environmental factors, when present during critical periods of development, such as lactation, can play a fundamental role in health during childhood and/or adulthood, a phenomenon known as "metabolic programming." In this context, the intake of probiotics like milk kefir during this period may result in beneficial effects on the intestinal microbiota of newborns. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of milk kefir consumption by lactating Wistar rats during lactation on the microbiota of maternal milk and the gut microbiota and health of the overfed offspring during the neonatal period. In this study, lactating Wistar rats and their offspring were divided into four groups: normal litter (NL), kefir normal litter (KNL), small litter (SL), and kefir small litter (KSL), based on litter size (NL: 10 or SL: 3) and probiotic consumption. The rats were daily fed via gavage with commercial feed + water (NL and SL) or commercial feed + probiotics (1.0×10^8 CFU/mL). The body weight of the offspring was assessed daily, with the overfed groups gaining more weight over 21 days. Sequencing of the 16S rRNA gene in maternal milk revealed the predominance of the phyla Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteriota, with some differences in the abundances of bacterial genera observed between groups. Sequencing of the offspring's intestinal microbiota showed variation in beta diversity, and the phyla Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria, and Campylobacterota were the most abundant. Some differences in the abundances of bacterial genera in the intestinal microbiota were also observed between groups. No statistically significant differences were found in the morphometric analysis of intestinal crypts between groups, as well as in the analysis of short-chain fatty acid concentration in the offspring's feces. Thus, maternal milk kefir consumption during lactation had positive effects on the intestinal microbiota of the offspring, particularly at the phylum level, and a possible influence of litter size on the maternal milk microbiota was observed. However, one

aspect to be considered is the short period of 21 days, which indicates the need for further research to fully understand the potential benefits of milk kefir on the microbiota and intestinal health.

Keywords: metabolic programming; lactation; probiotics; kefir.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	17
LISTA DE FIGURAS.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Programação metabólica.....	23
2.2 Superalimentação.....	24
2.3 Lactação.....	29
2.4 Microbiota intestinal.....	32
2.5 Kefir de leite.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Modelo experimental.....	40
4.2 Obtenção e preparo do kefir de leite.....	41
4.3 Contagem microbiológica do kefir de leite.....	42
4.4 Avaliação do estado nutricional da prole de ratas wistar.....	43
4.5 Caracterização da microbiota do leite materno e da microbiota intestinal da prole.....	43
4.6 Extração e dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes da prole de ratas wistar.....	44
4.7 Análise histológica do cólon da prole de ratas Wistar.....	45
4.8 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação do estado nutricional da prole de ratas Wistar.....	47
5.2 Caracterização da microbiota do leite materno.....	48

5.3 Caracterização da microbiota do leite materno e da microbiota intestinal da prole.....	51
5.4 Concentração dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes da prole de ratas Wistar.....	58
5.5 Análise histológica do cólon da prole de ratas Wistar.....	59
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	67
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
9 REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).....	81

LISTA DE SIGLAS

DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença
MI	Microbiota intestinal
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFC	Unidades formadoras de colônias
BAL	Bactérias do ácido-lático
MRS	Meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe
ASV	Amplicon sequence variants
DADA2	Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
OMS	Organização Mundial da Saúde
TGI	Trato Gastrointestinal
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
CHS	Hidróxido de cálcio
CSR	Sulfato cúprico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- O modelo epigenético das origens do desenvolvimento da doença.....	25
Figura 2	- Efeitos da superalimentação precoce na vida adulta em descendentes criados em ninhadas pequenas.....	27
Figura 3	- Hipótese da transferência enteromamária.....	31
Figura 4	- Hipótese da transferência de fluxo retrógrado.....	31
Figura 5	- Colonização microbiana longitudinal e transversal do TGI.....	32
Figura 6	- O papel da microbiota intestinal na produção de ácidos graxos de cadeia curta e seus benefícios para a regulação da fisiologia humana.....	35
Figura 7	- Modelo experimental.....	41
Figura 8	- Preparo do kefir de leite.....	42
Figura 9	- Peso dos animais ao longo de 21 dias (A) e aos 21 dias de idade (B).....	47
Figura 10	Riqueza e diversidade estimadas pelos índices de Chao e Shannon, respectivamente.....	48
-		
Figura 11	- Gráfico de barras das abundâncias relativas dos filos bacterianos mais abundantes na microbiota do leite de cada grupo.....	49
Figura 12	- Abundâncias relativas de filos bacterianos na microbiota do leite de cada grupo.....	49
Figura 13	- Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana do leite materno no nível de gênero entre os grupos NL e SL.....	50
Figura 14	- Curvas de rarefação geradas para cada amostra.....	51
Figura 15	- Riqueza estimada pelo índice de Chao.....	52
Figura 16	- Diversidade alfa avaliada pelo índice de Shannon.....	52
Figura 17	- Análise de Coordenadas do Princípio da Diversidade Beta (PCoA) usando distância UniFrac ponderada destacando diferenças entre a comunidade microbiana (A) e Centróides de ordenação e dispersão de amostras de <i>clusters</i> obtidos em PCoA usando distância UniFrac ponderada (B).....	53

Figura 18 - Gráfico de barras das abundâncias relativas dos filos bacterianos mais abundantes na microbiota intestinal de cada grupo.....	54
Figura 19 - Abundâncias relativas dos filos bacterianos na microbiota intestinal de cada grupo.....	55
Figura 20 - Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos NL e SL.....	56
Figura 21 - Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos NL e KNL.....	56
Figura 22 - Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos SL e KSL.....	57
Figura 23 - Concentração dos ácidos acético (A), butírico (B) e propiônico (C) em $\mu\text{mol/g}$ de fezes da prole de ratas Wistar.....	58
Figura 24 - Histologia do cólon. Imagens representativas obtidas do cólon de ratos NL (A), KNL (B), SL (C) e KSL (D). Ampliação de 10x...	59

1 INTRODUÇÃO

Os fatores ambientais, especialmente os nutricionais, quando presentes em períodos críticos do desenvolvimento, como gravidez, lactação e primeira infância, podem desempenhar um papel fundamental nesses períodos e influenciar a saúde durante a infância e/ou vida adulta, podendo estar relacionados ao desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs). Inicialmente, esse evento foi denominado “programação metabólica” (BARKER *et al.*, 1993; AGOSTI *et al.*, 2017; ROSENFELD 2017; KOLETZKO *et al.*, 2019; KORPELA *et al.*, 2018). No entanto, mais recentemente, tem sido definido como “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença” (Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD), uma vez que o ambiente pode atuar tanto negativa quanto positivamente na saúde da prole e nos desfechos de doenças posteriores (VIEIRA *et al.*, 2018 ; ROSENFELD, 2017; SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022; KOLETZKO *et al.*, 2019).

As janelas de oportunidade são fases sensíveis às conexões neurais e podem determinar o desenvolvimento do sistema nervoso central e de outros associados a este. A lactação é o período de maior plasticidade e maturação de muitos órgãos e sistemas e é uma janela pós-natal muito importante, pois qualquer alteração na composição do leite materno pode comprometer a saúde do recém-nascido. Fatores externos presentes durante o período neonatal influenciam fortemente a composição da microbiota intestinal (MI). A MI apresenta maior flexibilidade de adaptação a novas condições nesse período, se comparado às fases posteriores da vida (THRIENE; MICHELS, 2023). Apesar do crescente número de estudos, os mecanismos de programação e seu impacto em diferentes janelas permanecem desconhecidos (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022; PICÓ *et al.*, 2021).

Um modelo muito estudado de programação em roedores é a redução do tamanho da ninhada, que é um modelo de superalimentação pós-natal precoce, pela redução do número de filhotes na ninhada durante o período de lactação. Neste modelo, no início da vida, a ninhada é reduzida para três ou quatro filhotes por mãe, enquanto a ninhada de controle é mantida em oito a 12 filhotes por mãe. Portanto, uma ninhada pequena apresenta maior ingestão de leite por filhote do que uma ninhada de tamanho normal, pois o filhote apresenta auto-regulação da saciedade prejudicada, interrompendo a sucção quando seu trato gastrointestinal (TGI) está muito distendido. Devido a essa superalimentação precoce, a prole superalimentada

tem ganho de peso corporal acelerado e aumento da adiposidade antes do desmame, com peso corporal 30% maior que a prole controle ao final da lactação e durante a vida adulta (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). Dessa forma, essa intervenção tem efeitos sobre a disponibilidade de leite, peso corporal e também sobre a MI (GONZÁLEZ-HEDSTRÖM *et al.*, 2020), como visto em um estudo realizado por nosso grupo (BRASIEL *et al.*, 2022).

A MI é o conjunto de microrganismos que coexistem no intestino de um indivíduo (MARTÍN-PELÁEZ *et al.*, 2022). O estabelecimento inicial do microbioma em bebês pode ser estruturado por uma combinação de genética do hospedeiro e influências ambientais, como modo de parto, colonização placentária, tipo de alimentação infantil e dieta materna (ALVES *et al.*, 2019). Evidências recentes mostram que, após o nascimento, o determinante mais importante da colonização intestinal infantil é a lactação (RAUTAVA, 2016). A lactação representa um período em que a composição da microbiota pode ser modificada na mãe e no recém-nascido e a composição bacteriana do leite materno está intimamente relacionada com a dos bebês, indicando a existência da passagem de bactérias da mãe para o filho durante o processo de lactação (MARTÍN-PELÁEZ *et al.*, 2022; PICÓ *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; BERGMANN *et al.*, 2014). A MI também é responsável pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) através da fermentação de carboidratos não digeríveis (WANG *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2014; MORRISON; PRESTON, 2016). Os principais produtos são o acetato, propionato e butirato. Estes são importantes para a homeostase da glicose, função imune e integridade intestinal, sendo substratos importantes para manter o epitélio colônico (MORRISON; PRESTON, 2016). Dessa forma, uma MI equilibrada irá contribuir na produção dos AGCC e, conseqüentemente, na saúde intestinal.

Tem sido sugerido que a ingestão de probióticos (microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro), principalmente durante a lactação, resulta em efeitos benéficos na MI dos recém-nascidos. Estas intervenções são mais eficazes quando a ingestão se inicia logo após o nascimento, e se a intervenção realizada na mãe pode influenciar a MI da prole no início da vida, este período torna-se uma oportunidade para melhorar a saúde a curto prazo e na vida adulta (MARTÍN-PELÁEZ *et al.*, 2022; FAO/OMS, 2006; WANG *et al.*, 2021; SINDI *et al.*, 2021). Dessa forma, o kefir de leite, bebida que contém microrganismos potencialmente probióticos, como as

bactérias do ácido-lático (BAL), e produzida de forma artesanal a partir da adição de grãos de kefir ao leite (DIAS *et al.*, 2016; DIMIDI *et al.*, 2019), tem apresentado efeitos positivos sobre a modulação da MI (PELUZIO *et al.*, 2021; AZIZI *et al.*, 2021; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, usando o mesmo modelo de programação metabólica, foi demonstrado que o tratamento com kefir de leite foi capaz de reduzir o depósito de tecido adiposo e a inflamação da mucosa do cólon, melhorar a composição da MI e diminuir a carcinogênese colorretal (BRASIEL *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos também mostraram diminuição da inflamação, observada por parâmetros histológicos, no cólon de ratos e camundongos suplementados com kefir ou bactérias presentes no kefir (CARASI *et al.*, 2014; LENOIR *et al.*, 2016).

Nesse contexto, com esse trabalho, foi possível determinar os efeitos do consumo do kefir de leite em uma fase crítica do desenvolvimento, e o seu impacto na saúde e microbiota intestinais da progênie ao final da lactação. Assim, pela primeira vez, são investigados os efeitos do consumo materno de kefir de leite durante a lactação sobre a microbiota do leite materno e da MI de ratos superalimentados no período neonatal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Programação metabólica

A exposição precoce da prole a um ambiente adverso durante períodos críticos do desenvolvimento, como o período pré-natal e a lactação, pode aumentar a suscetibilidade às DCNT ao longo da vida, como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, doenças alérgicas, doenças pulmonares crônicas, doenças renais, deficiências neurocognitivas, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), síndrome metabólica e alguns tipos de câncer (PAUL *et al.*, 2016; HSU; TAIN, 2019; PENKLER *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2022; ZHOU; XIAO, 2018). A associação entre influências nutricionais, ambientais e hormonais durante esses períodos críticos no início da vida e mudanças no metabolismo na idade adulta é chamada de programação metabólica (MAIA *et al.*, 2014; CALATAYUD; KOREN; COLLADO, 2019; DOI; USUI; SHIMADA, 2022; BARKER *et al.*, 1993). A habilidade de um genótipo gerar diversos fenótipos em resposta a ambientes variados é chamada de plasticidade e ela atinge sua expressão máxima durante o processo de desenvolvimento, representando um processo adaptativo do ponto de vista evolutivo (HSU; TAIN, 2019). Uma espécie é considerada bem adaptada e adequada em termos evolutivos quando consegue sobreviver para se reproduzir, mantendo uma relativa consistência fenotípica ao longo de várias gerações (HOCHBERG *et al.*, 2011; HSU; TAIN, 2019; SOLOMONS, 2009). A plasticidade é um fenômeno de transformação somática adquirida e irreversível, proporcionando ao organismo uma maior adaptabilidade, funcionalidade e sucesso ao lidar com condições ambientais ou desafios extremos (HSU; TAIN, 2019). Os ambientes mudam continuamente e uma espécie adapta o seu fenótipo ao ambiente predominante, mesmo quando a mudança ambiental é perturbadora ou mesmo catastrófica (SOLOMONS, 2009).

Dentre as influências importantes nesse período, a alimentação materna tem um papel de extrema relevância no crescimento e desenvolvimento do feto. Sabe-se que condições nutricionais desfavoráveis durante a gravidez podem causar alterações permanentes na estrutura e função de órgãos específicos na prole, alterando os processos de saúde e doença tanto a longo como a curto prazo, dada a plasticidade dos órgãos em desenvolvimento (HSU; TAIN, 2019; CALATAYUD; KOREN; COLLADO, 2019). As consequências desses impactos nutricionais são

variáveis e dependem de diversos fatores, incluindo o tipo de nutriente, a duração e intensidade da exposição, a espécie, o sexo e as janelas de tempo críticas durante o desenvolvimento em que esses estímulos são aplicados (HSU; TAIN, 2019).

Por outro lado, a programação metabólica também pode gerar benefícios ao longo da vida humana, e desempenhar um papel importante na prevenção, intervenção precoce e tratamento terapêutico (DOI; USUI; SHIMADA, 2022). Muitos estudos em modelo animal mostram a possibilidade de reverter a programação do desenvolvimento de doenças em adultos por meio de intervenções nutricionais realizadas durante o período de plasticidade do desenvolvimento, a fim de oferecer novas estratégias de reprogramação. Dessa forma, hoje esse fenômeno é conhecido como DOHaD, porque pôde-se reconhecer que esse fenômeno está relacionado tanto à vida fetal quanto ao desenvolvimento posterior. Além disso, foi constatado que o desenvolvimento afeta também a saúde dos indivíduos na vida adulta, e não apenas o risco da aquisição de doenças (PENKLER *et al.*, 2019). Então, não só efeitos negativos podem ocorrer no início da vida, mas estratégias para reverter os processos de programação também podem ser implementadas, evitando que o fenótipo clínico de uma doença se torne evidente (HSU; TAIN, 2019).

A base da teoria DOHaD pode ser explicada por meio da epigenética. A epigenética representa um mecanismo molecular que modifica a expressão genética por meio de alterações químicas no DNA, sem impactar as sequências genômicas. Este processo é sensível aos estímulos do ambiente, refletindo assim a interação entre fatores genéticos e ambientais (Figura 1) (DOI; USUI; SHIMADA, 2022; HOCHBERG *et al.*, 2011). Embora nem todos os meios pelos quais a epigenética pode ser influenciada sejam totalmente compreendidos, os dois principais mecanismos que se destacam são as alterações nas proteínas associadas à cromatina, que desempenham um papel estrutural para o DNA durante a transcrição, e alterações no nível de metilação das bases nucleotídicas do DNA. Ambas as vias de modulação da expressão genética por meio de alterações epigenéticas estão intimamente associadas aos nutrientes, refletindo assim a dieta e o estado nutricional (SOLOMONS, 2009; GRECH *et al.*, 2021).

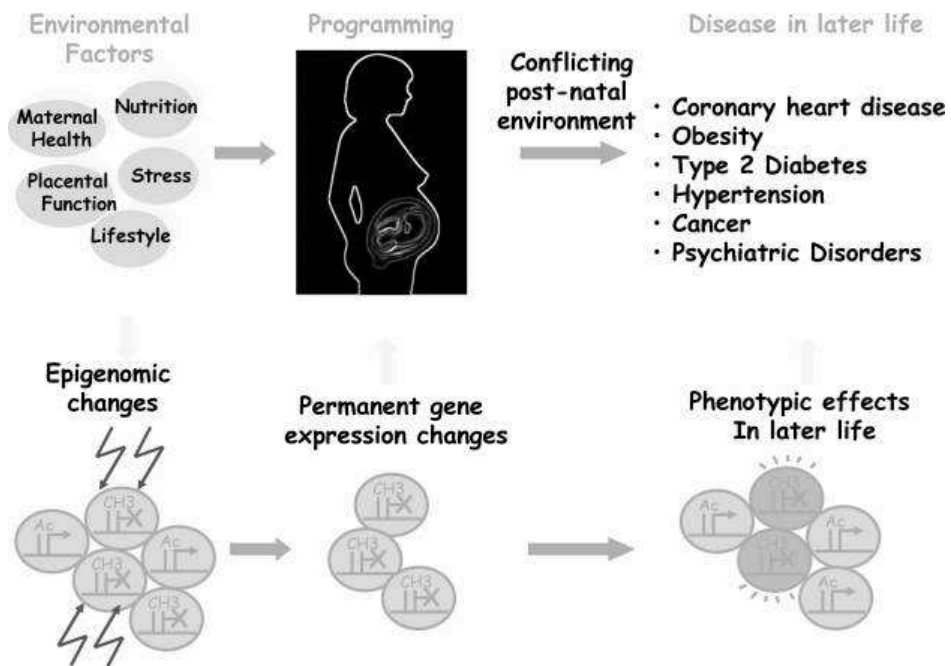


Figura 1. O modelo epigenético das origens do desenvolvimento da doença (HOCHBERG *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços, há ainda muito a ser compreendido sobre os mecanismos de programação metabólica, embora a epigenética contribua para esclarecer como a exposição a fatores ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento resulta em alterações na vida adulta.

2.2 Superalimentação

O aumento alarmante da incidência global da obesidade e das complicações de saúde a ela relacionadas representa um desafio significativo para os sistemas de saúde em todo o mundo. Um dos fatores que contribuem para esse aumento é a crescente prevalência da obesidade infantil, uma condição associada ao desenvolvimento de complicações relacionadas à obesidade a longo prazo (TEJERA-MUÑOZ *et al.*, 2023; SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

Nesse contexto, a epidemia global de obesidade pode não apenas estar ligada ao padrão de alimentação ocidental, mas também ao fato de que as gerações mais recentes estão sendo expostas, durante fases cruciais de desenvolvimento, a influências capazes de programar o organismo para o sobrepeso e a obesidade na vida adulta. Essa programação parece persistir mesmo quando a dieta é apropriada após esses períodos críticos (ARGENTE-ARIZÓN *et al.*, 2016; BARKER, 2007; COLLDEN *et al.*, 2015; LONG *et al.*, 2015; SPENCER, 2012).

Sendo assim, o modelo de redução de ninhada é um método experimental reconhecido para simular a superalimentação precoce em roedores, envolvendo a redução do número de filhotes das ninhadas durante o período de lactação. Neste modelo, no início da vida, a ninhada é reduzida para três ou quatro filhotes por mãe, enquanto a ninhada controle é mantida com oito a 12 filhotes por mãe. Diferentemente das mães roedoras que normalmente têm menos mamilos do que filhotes, gerando competição pela amamentação, no modelo de redução do tamanho da ninhada, o número de mamilos da mãe é maior que o número de filhotes, eliminando essa competição. Isso resulta em uma ninhada pequena com uma ingestão de leite por filhote aproximadamente 1,5 vezes maior que uma ninhada de tamanho normal (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que os recém-nascidos parecem não ter controle sobre a quantidade de ingestão até o 14º-16º dia após o nascimento. Dessa forma, quando há uma grande oferta de leite, os filhotes consomem a quantidade máxima que seus estômagos podem suportar. Esse consumo abundante pode resultar em superalimentação, uma vez que o controle hipotalâmico no início da vida pós-natal ainda não está completamente desenvolvido (MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; SEKAR; WANG; CHOW, 2017).

Além disso, a composição do leite das mães das ninhadas reduzidas é

modificada, apresentando maior teor lipídico e menores quantidades de proteína (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). Devido a essa superalimentação precoce, a prole superalimentada exibe um ganho acelerado de peso corporal e aumento da adiposidade antes do desmame, apresentando um peso corporal 30% maior que a prole controle ao desmame. Estudos experimentais relataram hiperfagia, maior adiposidade corporal, níveis elevados de triglicerídeos séricos, insulina e colesterol, aumento da pressão arterial sistólica, diminuição da contratilidade cardíaca e resposta modificada à angiotensina II, tanto no coração quanto nos vasos sanguíneos, além de modificação da MI na vida adulta da prole superalimentada, caracterizando um fenótipo de síndrome metabólica. Essas características são resultado de modificações adaptativas em resposta à superalimentação precoce, envolvendo alterações epigenéticas e hormonais em mecanismos centrais e periféricos responsáveis pelo controle da ingestão alimentar e do equilíbrio energético na idade adulta, o que favorece a obesidade (Figura 2) (BRASIEL *et al.*, 2022; GONZÁLEZ-HEDSTRÖM *et al.*, 2020; TEJERA-MUÑOZ *et al.*, 2023; SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

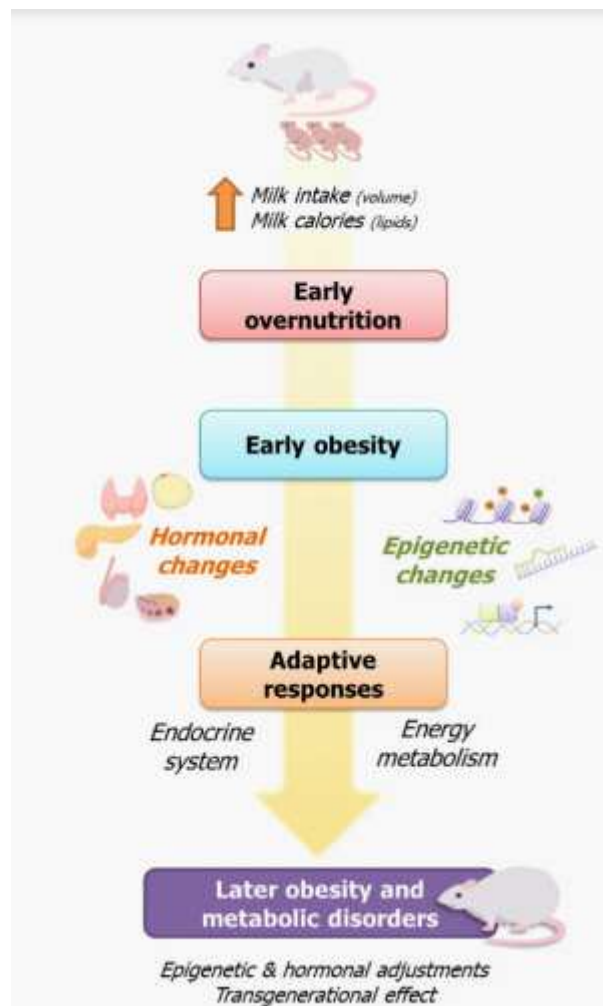


Figura 2. Efeitos da superalimentação precoce na vida adulta em descendentes criados em ninhadas pequenas (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

Esse modelo é bem elucidado em animais, pois estes são importantes ferramentas para a investigação dos mecanismos fundamentais da programação do desenvolvimento. Roedores são mamíferos que compartilham semelhanças em embriologia, anatomia e fisiologia com os humanos. A utilização desses animais como modelo experimental tem contribuído significativamente para a ampliação do entendimento dos mecanismos da DOHaD. Os roedores apresentam vantagens práticas e econômicas na pesquisa, e o efeito da manipulação da prole pode ser observado em curtos períodos de tempo (WILLIAMS *et al.*, 2014; TAIN; HSU, 2022). Ratos da linhagem Wistar são um dos mais utilizados em pesquisas e, quando comparados com camundongos, possuem algumas vantagens, como o maior tamanho, facilidade de manipulação e a capacidade de possuírem maior resistência a intervenções externas. Além disso, a gestação é mais prolongada (WILLIAMS *et al.*, 2014; TAIN; HSU, 2022). Dessa forma, ratos Wistar têm sido escolhidos com frequência como modelo animal para estudos de programação metabólica.

2.3 Lactação

As janelas de oportunidade representam períodos sensíveis às conexões neurais e desempenham um papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso central. Essas modificações podem acarretar implicações de longo prazo em processos fundamentais relacionados a distúrbios metabólicos (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; PICÓ *et al.*, 2021). Assim, impactos durante essas fases iniciais podem programar doenças ou prevenir alguma condição ao longo da vida. No entanto, a mesma intervenção pode programar diferentes fenótipos na vida adulta de acordo com a janela de programação. Mesmo com diversos estudos na literatura abordando esse tema, os mecanismos de programação e seu impacto em janelas diferentes permanecem desconhecidos (PICÓ *et al.*, 2021).

A lactação representa uma janela pós-natal de extrema importância, e qualquer modificação na composição do leite materno pode ter sérias implicações para a saúde do recém-nascido. Os desafios nutricionais e ambientais maternos durante a lactação afetam a composição do leite e, portanto, a diferenciação, estrutura e função dos órgãos da prole durante esse período (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a alimentação exclusiva com leite materno nos primeiros seis meses de vida como medida para diminuir o risco de desenvolver condições como diabetes, obesidade e hipertensão na vida adulta, entre outras. Ao contrário disso, períodos prolongados de amamentação estão associados a um menor risco de obesidade infantil e também adulta (PICÓ *et al.*, 2021; RAMOS-ROMAN, 2018).

O leite materno é o elo pós-natal mais importante entre a mãe e o bebê e tem sido considerado a melhor fonte de nutrição para os recém-nascidos (RAMIREZ *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2023; PICÓ *et al.*, 2021). O leite materno contribui para a maturação fisiológica e molecular de diversos sistemas, desempenhando um papel crucial na maturação final dos órgãos e no desenvolvimento corporal do recém-nascido. A composição do leite materno é afetada pela dieta materna, pelo estado metabólico materno e pela composição corporal da mãe (PICÓ *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2023). Além dos macronutrientes (proteína, gordura e lactose), micronutrientes (minerais e vitaminas), oligossacarídeos, hormônios e fatores imunológicos, o leite materno contém uma microbiota e os microrganismos derivados

do leite materno auxiliam na construção de uma microbiota benéfica para os neonatos (RAMIREZ *et al.*, 2021; PICÓ *et al.*, 2021). A composição do leite não é homogênea em termos de conteúdo nutricional e quantidade. Ela é dinâmica e varia conforme diversos fatores. Mesmo em um mesmo indivíduo, o volume e a composição do leite materno sofrem alterações de acordo com o estágio da lactação (colostró/leite maduro), a hora do dia e o curso da sucção (primeiro e último leite), entre outros aspectos. Além disso, há variações entre indivíduos devido a fatores genéticos, bem como em resposta a condições ambientais e maternas, especialmente o estado metabólico e os elementos dietéticos. Esse estado metabólico pode impactar não apenas a composição nutricional, mas também o microbioma do leite (PICÓ *et al.*, 2021).

O leite materno se destaca como o principal contribuinte para o estabelecimento e desenvolvimento da MI da prole, proporcionando uma ingestão diária de quase um milhão de bactérias originadas do leite materno, além de possuir oligossacarídeos que atuam como prebióticos, importantes no processo de colonização da MI. O tipo de leite também exerce influência na diversidade da MI dos bebês, resultando em diferenças significativas na composição entre aqueles alimentados exclusivamente com leite materno e os alimentados com fórmula, conforme evidenciado por diversos estudos epidemiológicos (PICÓ *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2023; MARTÍNEZ-OCA *et al.*, 2023).

As origens das bactérias presentes no leite materno ainda não foram completamente esclarecidas, e essas bactérias podem provir da pele materna, da cavidade oral do bebê, do ambiente circundante e do intestino materno. Atualmente, a cavidade oral neonatal e o TGI materno são considerados as duas principais fontes de microrganismos presentes no leite. Pesquisadores propuseram a "hipótese da transferência enteromamária" (Figura 3) e a "hipótese da transferência de fluxo retrógrado" (Figura 4) para explicar a origem da microbiota no leite humano. A hipótese da transferência enteromamária sugere que os microrganismos provenientes da mãe se associam à IgA no intestino, formando um complexo IgA+. As células plasmáticas IgA+ migram para o tecido mamário através das placas de Peyer intestinais (PPs), liberando microrganismos e secretando IgA. Dessa forma, os recém-nascidos que são amamentados adquirem não apenas nutrientes, mas também microrganismos presentes no leite. Esses microrganismos podem colonizar o intestino neonatal. Já a hipótese de transferência de fluxo retrógrado, propõe que a

microbiota da pele materna, da cavidade oral fetal e do ambiente, entre na glândula mamária materna durante a lactação, compondo assim a comunidade microbiana do leite (TIAN *et al.*, 2023).

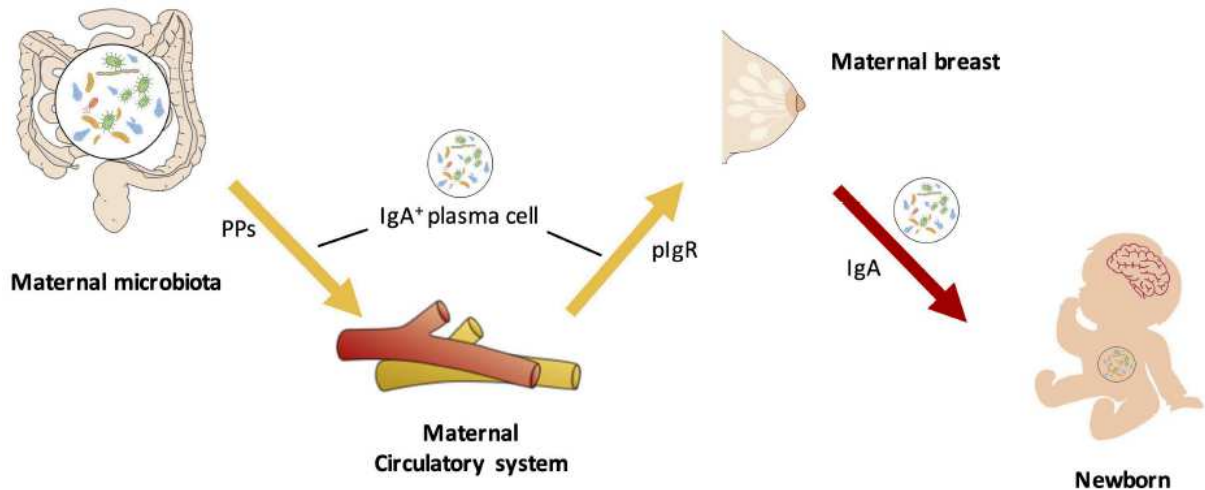


Figura 3. Hipótese da transferência enteromamária. PPs = Placas de Peyer; IgA = Imunoglobulina A; pIgR = Receptor de imunoglobulina polimérica (TIAN *et al.*, 2023).

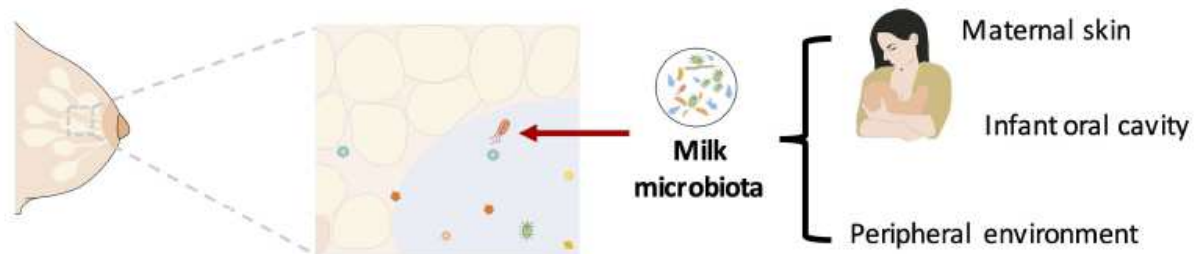


Figura 4. Hipótese da transferência de fluxo retrógrado (TIAN *et al.*, 2023).

2.4 Microbiota intestinal

O organismo humano abriga trilhões de células microbianas cujas ações coordenadas desempenham um papel crucial na vida humana (MILANI *et al.*, 2017; PEREZ-MUÑOZ *et al.*, 2017). Cada região do organismo possui seu microbioma específico, sendo colonizada por diferentes microrganismos como bactérias, vírus, fungos e arqueas, cada um com seu papel na manutenção de um microbioma saudável (WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021).

A MI é o conjunto de microrganismos que residem no intestino e possui composição e quantidade variadas dependendo da porção do TGI. A quantidade de microrganismos aumenta ao longo do TGI, com concentração mínima no estômago e máxima no cólon (Figura 5). Além disso, os microrganismos variam não só longitudinalmente, mas também de acordo com a camada intestinal, possuindo maior diversidade no lúmen e menor diversidade no epitélio (Figura 5). Essa microbiota se desenvolve ao longo da infância do hospedeiro, partindo de uma composição inicialmente diversa e heterogênea durante os primeiros dias de vida, para uma comunidade menos diversa e semelhante à dos adultos, por volta dos dois a três anos de idade (Figura 5) (MILANI *et al.*, 2017; WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021; SCHWAB, 2022).

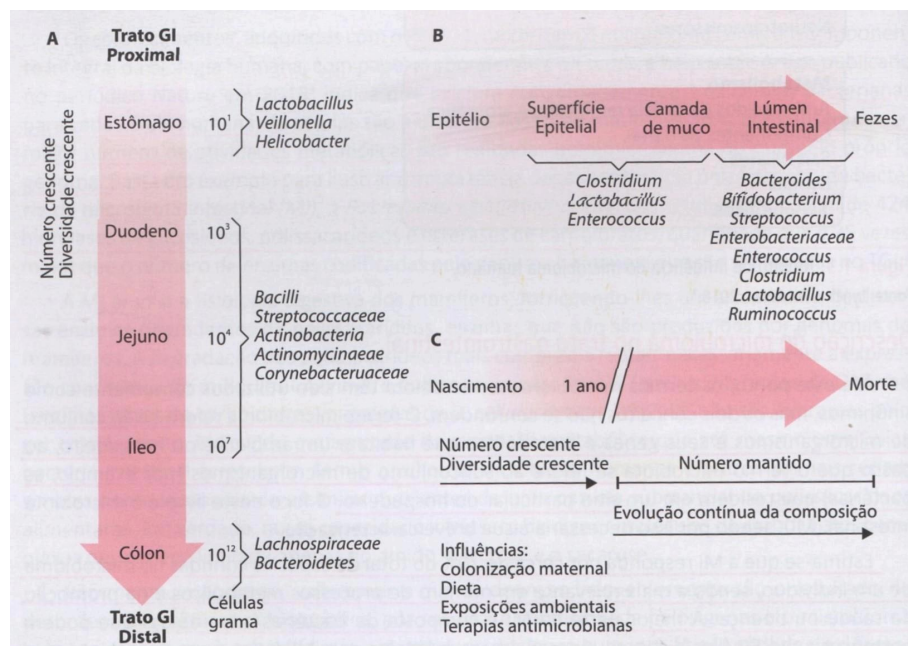


Figura 5. Colonização microbiana longitudinal e transversal do TGI (WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021).

No momento do nascimento, a microbiota é predominantemente aeróbica. No entanto, em poucos dias, o ambiente intestinal passa a ser anaeróbico, promovendo o crescimento de bactérias como *Bifidobacterium*. Este gênero torna-se dominante no intestino do lactente durante os primeiros meses de vida (ŁONIEWSKI *et al.*, 2022; BEZIRTZOGLU, 1997; EDWARDS, 2017; MOHAJERI *et al.*, 2018). Uma microbiota saudável é dominada principalmente por dois filos: Firmicutes e Bacteroidota, que somados correspondem a cerca de 80% do total (WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021).

A MI desempenha funções fisiológicas importantes, como auxiliar o hospedeiro na absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis, na digestão de carboidratos complexos e polissacarídeos vegetais, bem como na participação em atividades relacionadas ao metabolismo dos ácidos biliares. Além disso, a MI desempenha papéis essenciais na preservação da barreira epitelial intestinal, na regulação da permeabilidade intestinal, no estímulo à maturação do sistema nervoso entérico, no desenvolvimento da imunidade inata e na regulação da imunidade adaptativa (ZHOU; XIAO, 2018).

Estudos realizados em modelos animais e seres humanos indicam que o processo de colonização microbiana desempenha um papel relevante nos estágios iniciais da vida, visto que esse período representa uma fase crucial para o desenvolvimento imunológico e fisiológico (PEREZ-MUÑOZ *et al.*, 2017). A lactação é o principal contribuinte para colonização da MI através do leite materno, porém diversos fatores também impactam a colonização da MI, como o modo de parto, idade gestacional, microbiota materna, método de alimentação infantil e a exposição a antimicrobianos (GRECH *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2023; BEZIRTZOGLU, 1997; EDWARDS, 2017; MOHAJERI *et al.*, 2018; RAUTAVA, 2016).

Assim como existem fatores que favorecem a formação de uma microbiota saudável em recém-nascidos, como o parto vaginal, o nascimento a termo, a amamentação e a exposição a diversos microrganismos, existem fatores que impactam negativamente na diversidade e composição da MI na prole, como a cesariana, o nascimento prematuro, o uso de fórmula infantil e a exposição a antimicrobianos. Bebês prematuros tendem a apresentar uma colonização tardia da

MI com *Bifidobacterium* e têm uma alta prevalência de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* e *Enterococcaceae* (COLLADO *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

Em indivíduos saudáveis, a microbiota residente do intestino mantém uma relação de equilíbrio com o hospedeiro. Diversos fatores têm o potencial de provocar alterações no equilíbrio da microbiota, resultando na perturbação da homeostase intestinal e no surgimento do que é chamado de estado de disbiose. A interpretação exata da disbiose é controversa, devido à ausência de uma descrição precisa de uma microbiota considerada "normal" ou "saudável". A disbiose geralmente está associada a efeitos prejudiciais e pode acarretar consequências a longo prazo, contribuindo para distúrbios ou doenças, tais como obesidade, diabetes e doença inflamatória intestinal (MILANI *et al.*, 2017).

A MI também é responsável pela produção de AGCC através da fermentação de carboidratos não digeríveis (WANG *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2014; MORRISON; PRESTON, 2016). Durante a gestação, as alterações no microbioma intestinal resultam em variações nos níveis de AGCCs (TANG; MARROQUIN, 2022; YU *et al.*, 2022; SCHWAB, 2022). Estudos têm evidenciado que os AGCCs desempenham um papel na regulação da homeostase da glicose, no metabolismo lipídico e na resposta imunológica. Além disso, já foi demonstrado que esses compostos melhoram a integridade da barreira intestinal e fortalecem a função imunológica da mucosa. Entre os AGCCs mais abundantes estão o ácido acético, o ácido propiônico e o ácido butírico, sendo este último a principal fonte de energia para os colonócitos (PINTO *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2022). Estes representam aproximadamente 80% de todos os AGCC (NOGAL; VALDES; MENNI, 2021). Os AGCC que não agem como fonte de energia para os colonócitos são imediatamente incorporados na veia porta hepática por mecanismos de transporte passivos e ativos e contribuem para o funcionamento ideal de vários órgãos (MACHATE *et al.*, 2020). Os efeitos benéficos dos AGCCs produzidos pela MI estão resumidos na Figura 6 (MACHATE *et al.*, 2020).

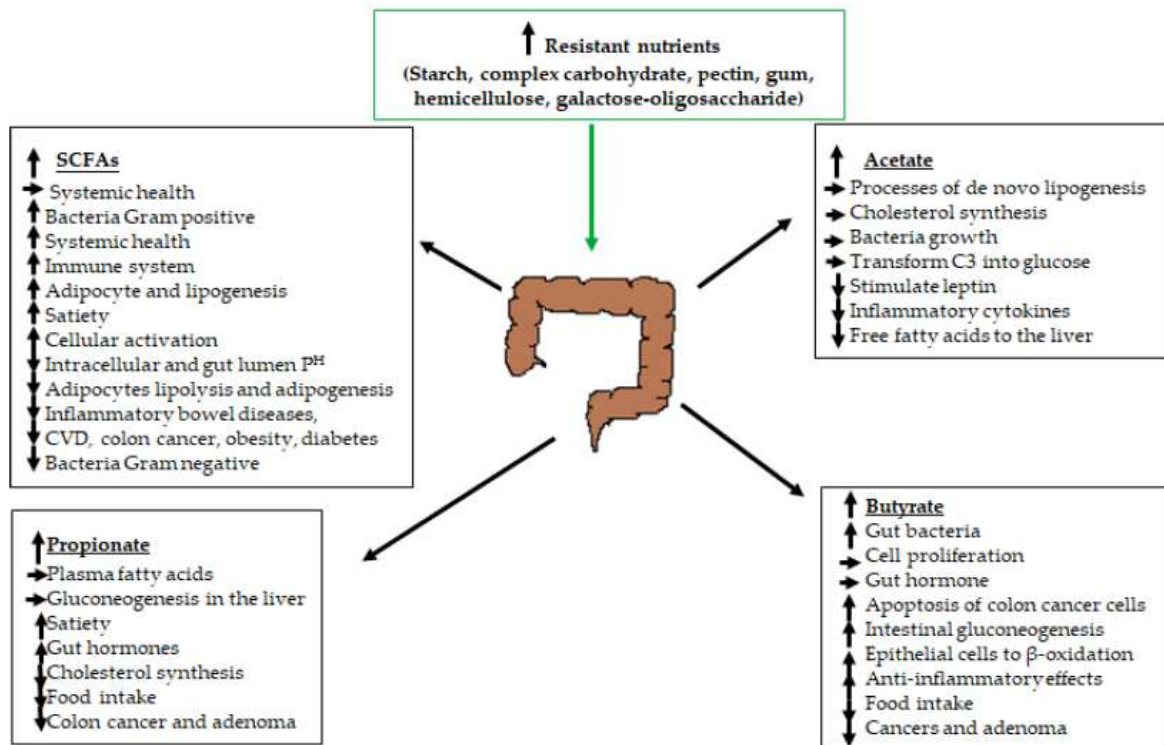


Figura 6. O papel da microbiota intestinal na produção de ácidos graxos de cadeia curta e seus benefícios para a regulação da fisiologia humana. ↑ = aumento significativo; ↓ = diminuição significativa; → = desempenho estável; C3 = propionato; DCV = doenças cardiovasculares (MACHATE *et al.*, 2020).

A maior parte dos carboidratos não digeridos sofre fermentação no ceco e no cólon ascendente, enquanto a absorção dos AGCCs ocorre ao longo de todo o cólon. Observa-se uma correlação negativa entre as concentrações de AGCCs e o pH. Nas regiões do ceco e cólon ascendente, onde o pH é aproximadamente 5,6, registram-se as concentrações mais elevadas de AGCCs, enquanto no sigmoide e reto, com pH mais elevado (aproximadamente 6,6), as concentrações de AGCCs são mais baixas. No cólon, acetato, propionato e butirato são encontrados em uma proporção aproximada de 3:1:1, respectivamente (NOGAL; VALDES; MENNI, 2021; MACHATE *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; PORTINCASA *et al.*, 2022).

Bactérias pertencentes ao filo Firmicutes possuem capacidade de produzir butirato e este papel é crucial na preservação da integridade da barreira epitelial intestinal (ZHOU; XIAO, 2018). Dessa forma, a redução nos níveis circulantes de

butirato pode resultar no aumento da permeabilidade intestinal, facilitando a transferência microbiana do conteúdo intestinal para a corrente sanguínea, e provocando um desequilíbrio da MI (TANG; MARROQUIN, 2022). Outros microrganismos, como os pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Prevotella* e *Akkermansia*, também foram descritos como importantes produtores de AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato (GUIMARÃES *et al.*, 2020).

2.5 Kefir de leite

Tem sido sugerido que a ingestão de probióticos resulta em efeitos benéficos na MI dos recém-nascidos (MARTÍN-PELÁEZ *et al.*, 2022). Um exemplo de produto com características probióticas é o kefir de leite, uma bebida fermentada, produzida artesanalmente através da adição de grãos de kefir ao leite, que teve sua origem nas montanhas caucasianas da Rússia (MAGALHÃES, 2008; DIAS, 2016). Os grãos de kefir apresentam uma matriz composta por polissacarídeos e proteínas. Nessa matriz, coexistem BAL, bactérias ácido-acéticas e leveduras, formando uma associação simbiótica (MAGALHÃES, 2008; CAETANO; MONTANHINI, 2014; ROSA *et al.*, 2017; BENGGOA *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2013). A presença de microrganismos no kefir varia de acordo com a origem e o armazenamento dos grãos, a duração de sua utilização, a composição química do leite, a temperatura de fermentação e a tecnologia empregada em sua manipulação (MAGALHÃES, 2008; BENGGOA *et al.*, 2018).

O kefir de leite é considerado um alimento probiótico. O termo probiótico, de acordo com a OMS, se refere a “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem algum benefício para a saúde” (FAO; WHO, 2006). Os microrganismos mais comumente identificados nos grãos de kefir de leite incluem BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*; bactérias ácido-acéticas do gênero *Acetobacter*; e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* (DIAS, 2016; ROSA *et al.*, 2017; BENGGOA *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2013). O kefir de leite utilizado no presente estudo foi previamente analisado quanto à composição microbiana por sequenciamento e os principais gêneros bacterianos encontrados foram *Lactococcus*, *Bacteroides*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Lactobacillus* (BRASIEL *et al.*, 2021).

Estudos evidenciam que o consumo regular de kefir de leite pode gerar benefícios para a saúde, tais como melhora da digestão da lactose (HERTZLER; CLANCY, 2003; DE VRESE; KELLER; BARTH, 1992), efeitos antimicrobianos (RODRIGUES *et al.*, 2005; YERLIKAYA, 2019), efeitos na modulação do sistema imunológico (VINDEROLA *et al.*, 2005; CARASI *et al.*, 2015), redução do colesterol (GUO *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013), propriedades antioxidantes (LIU *et al.*, 2005; GAMBA *et al.*, 2020), efeitos anti-alérgicos (LEE *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2010),

aceleração do processo de cicatrização (RODRIGUES *et al.*, 2005), ações anti-inflamatórias (LEE *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2005), potencial anticarcinogênico (LIU *et al.*, 2002; CEVIKBAS *et al.*, 1994) e modulação da MI (MARQUINA *et al.*, 2002). Recentemente, nosso grupo de pesquisa evidenciou que o consumo materno de kefir de leite durante a lactação, com contínuo consumo de kefir de leite pela prole durante a puberdade, foi capaz de reduzir o depósito de tecido adiposo e a inflamação da mucosa do cólon, melhorar a composição da MI e diminuir a carcinogênese colorretal (BRASIEL *et al.*, 2022).

Assim, nossa hipótese é de que o consumo materno de kefir de leite durante a lactação pode modular a microbiota do leite materno, e consequentemente a da prole ao desmame, com repercussão na saúde intestinal precoce.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo de kefir de leite por ratas Wistar durante a lactação sobre a microbiota do leite materno e seu impacto na microbiota e saúde intestinal da progênie superalimentada no período neonatal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estado nutricional da prole durante a lactação;
- Determinar a microbiota do leite materno de ratas Wistar ao final da lactação (21 dias);
- Analisar a microbiota intestinal da prole de ratas Wistar com 21 dias de idade;
- Determinar a concentração dos AGCC no conteúdo fecal da prole de ratas Wistar com 21 dias de idade;
- Avaliar parâmetros histológicos da mucosa do intestino grosso da prole de ratas Wistar com 21 dias de idade.

4 METODOLOGIA

4.1 Modelo experimental

Todos os procedimentos seguiram os preceitos éticos para o uso e cuidado de animais experimentais, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (nº21/2016) (Anexo A).

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) com três meses de idade, 200 a 250 gramas, nulíparas, mantidas em gaiolas de plástico em biotério com temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($55\pm 10\%$) e ciclo claro-escuro (07-19h) controlados, foram acasaladas na proporção de três fêmeas para um macho e tiveram livre acesso a ração comercial e água filtrada. Os animais foram obtidos no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Um dia após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram ajustadas para dez ou três filhotes para cada mãe, e as ratas com suas respectivas ninhadas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos experimentais (Figura 7):

1) Grupo “Normal Litter” (NL): cuja ninhada foi ajustada para 10 filhotes e a rata lactante recebeu ração comercial + administração de água (1 mL/dia) por gavagem uma vez ao dia durante a lactação (n=5).

2) Grupo “Kefir Normal Litter” (KNL): cuja ninhada foi ajustada para 10 filhotes e a rata lactante recebeu ração comercial + administração de kefir de leite (1 mL/dia - $1,0\times 10^8$ UFC/dia) por gavagem uma vez ao dia durante a lactação (n=5).

3) Grupo “Small Litter” (SL): cuja ninhada foi ajustada para três filhotes e a rata lactante recebeu ração comercial + administração de água (1 mL/dia) por gavagem uma vez ao dia durante a lactação (n=5).

4) Grupo “Kefir Small Litter” (KSL): cuja ninhada foi ajustada para três filhotes e a rata lactante recebeu ração comercial + administração de kefir de leite (1 mL/dia - $1,0\times 10^8$ UFC/dia) por gavagem uma vez ao dia durante a lactação (n=5).

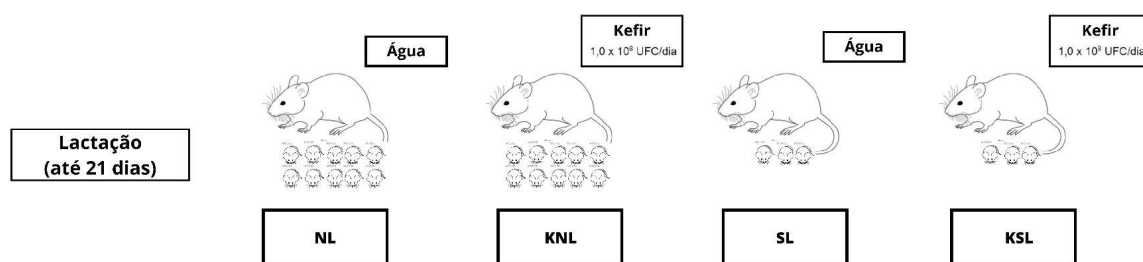


Figura 7. Modelo experimental.

A via de administração do kefir de leite e a quantidade a ser utilizada foram determinadas com base em estudos que demonstraram que essa dosagem é considerada segura e proporciona efeitos benéficos (ROSA *et al.*, 2017). É importante destacar que a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) utilizada foi aprovada pela legislação atual (BRASIL, 2008) como tendo ação probiótica.

Durante a lactação, as ratas receberam ração comercial (Nuvilab®, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. Ao final da lactação (21 dias) foi coletado o leite das ratas lactantes por extração manual. Para estimular a descida do leite, cada mãe foi separada de sua ninhada duas horas antes da ordenha e administrada uma dose única intraperitoneal de ocitocina. Foi administrado 1 mL de ocitocina para cada animal, na dose de 5 UI (FRANCO *et al.*, 2012) e, em seguida, as ratas e suas respectivas proles foram eutanasiadas com dose letal de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), após jejum de 8 horas. Foram coletadas amostras de cólon, bem como as fezes do ceco da prole. O leite materno e as fezes foram armazenados a -80°C e os tecidos intestinais foram fixados em formol para futuras análises.

4.2 Obtenção e preparo do kefir de leite

A produção do kefir de leite ocorreu pela adição direta dos grãos de kefir ao leite pasteurizado integral. Os grãos de kefir utilizados foram provenientes de uma cultura familiar disponível no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Para o cultivo, foi seguido rigorosamente o protocolo experimental, para garantir a

qualidade do kefir de leite fornecido aos animais. Os grãos de kefir previamente congelados a -20°C foram ativados e cultivados diariamente durante o período de tratamento dos animais. Os grãos foram inoculados na proporção de 1:10 em leite pasteurizado integral (Benfica®, Juiz de Fora, MG, Brasil), em recipiente de vidro esterilizado, e mantidos em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, em atmosfera aeróbia. Em seguida, os grãos foram separados do leite fermentado utilizando-se uma peneira e lavados com água destilada, seguindo procedimentos de assepsia. Os grãos retidos na peneira foram novamente inoculados no leite, repetindo-se essas etapas ao longo de todo o período de tratamento, conforme ilustrado na Figura 8. O leite fermentado fresco foi ofertado aos animais (BRASIEL *et al.*, 2020; OTLES; CADINGI, 2003; ROSA *et al.*, 2017; ALMEIDA; BRASIEL; LUQUETTI, 2022).

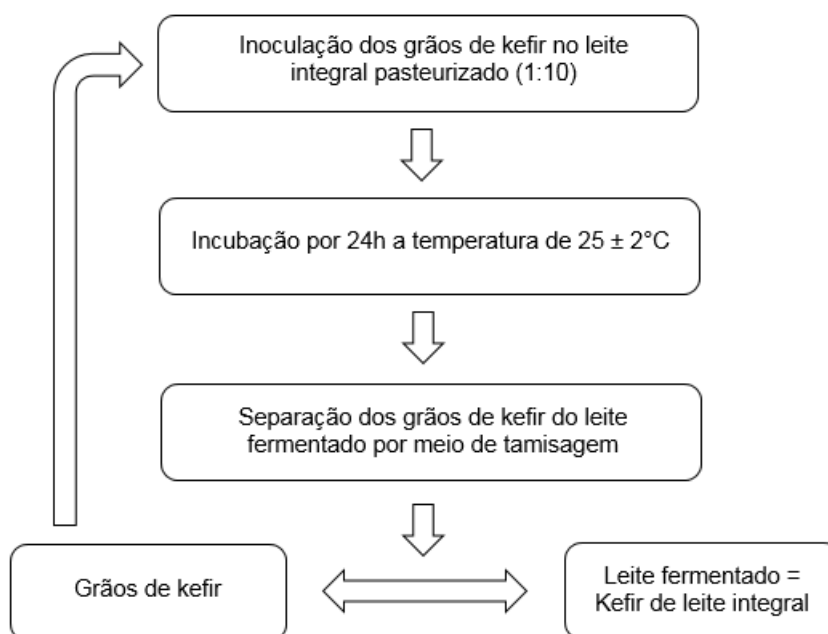


Figura 8. Preparo do kefir de leite (ALMEIDA; BRASIEL; LUQUETTI, 2022).

4.3 Contagem microbiológica do kefir de leite

Durante todo o tratamento dos animais, a contagem de BAL totais do kefir de leite foi realizada periodicamente, a cada dois dias, garantindo a oferta da número adequado de BAL aos animais (ALMEIDA; BRASIEL; LUQUETTI, 2022). A contagem de BAL foi conduzida utilizando o método de plaqueamento em superfície,

empregando a técnica de microgotas com diluições decimais em série (IBBA; ELASKY, 2016). Na superfície de cada placa contendo o meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemanha), foram inoculados 20 µL das diluições decimais 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} do kefir de leite. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48h em estufa para a contagem de UFC. A partir da fórmula: (média final da contagem de UFC x fator de diluição)/alíquota utilizada para o plaqueamento, determinou-se a quantidade de UFC/mL do kefir de leite (BRASIL, 2003). A contagem de BAL foi mantida em $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (ALMEIDA; BRASIEL; LUQUETTI, 2022), atendendo assim aos padrões propostos pelo órgão internacional Codex Alimentarius (WHO, 2011).

Também foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA da microbiota do leite fermentado utilizado no tratamento das ratas, para definir as comunidades bacterianas presentes no kefir de leite (BRASIEL *et al.*, 2021). Os principais gêneros bacterianos encontrados foram *Lactococcus*, *Bacteroides*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Lactobacillus* (BRASIEL *et al.*, 2021).

4.4 Avaliação do estado nutricional da prole de ratas wistar

A massa corporal da prole foi acompanhada diariamente durante os 21 dias de lactação através da pesagem dos animais em balança analítica.

4.5 Caracterização da microbiota do leite materno e da microbiota intestinal da prole

Para a análise das microbiotas do leite e do intestino, o DNA genômico total foi extraído das amostras de leite e de fezes dos grupos NL (n = 5), SL (n = 5), KNL (n = 5) e KSL (n = 5) através do kit de extração de DNA genômico (MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit, Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA foi inicialmente avaliado pela razão 260/280nm com o NanoDrop 1000 espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O sequenciamento de 16S rRNA de alto rendimento foi realizado para cada amostra pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). A região V3-V4 do gene bacteriano 16S rRNA das amostras de DNA foi amplificada usando

primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'). Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High Fidelity PCR MasterMix (New England Biolabs, EUA). Os produtos de PCR foram purificados com Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando o NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina, seguindo as recomendações do fabricante e os códigos de índice foram adicionados. A quantidade e a qualidade das bibliotecas foram avaliadas no Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, EUA) e no sistema Agilent Bioanalyzer 2100. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina, EUA) (2x 250bp), conforme sugerido pelo Earth Microbiome Project (CAPORASO *et al.*, 2012). As “amplicon sequence variants” (ASVs) foram inferidas usando o método DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016) e a taxonomia foi atribuída usando um método classificador bayesiano contra a versão 138 do banco de dados SILVA (PRUESSE *et al.*, 2007). Diversidade, análises filogenéticas e gráficos foram realizados com o auxílio de vários pacotes R (R CORE TEAM, 2019), incluindo phyloseq (McMURDIE; HOLMES, 2013), vegan (OKSANEN *et al.*, 2019), DECIPHER (WRIGHT, 2016), phangorn (SCHLIEP, 2011) e ggplot2 (WICKHAM, 2016). DESeq2 foi utilizado para identificar ASVs diferencialmente abundantes em comparações pareadas entre os grupos (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

4.6 Extração e dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes da prole de ratas wistar

As fezes do ceco coletadas foram acondicionadas a -80°C até o processamento. Segundo metodologia adaptada de Siegfried *et al.* (1984), os ácidos graxos foram extraídos de uma alíquota de 100 mg de fezes congeladas. Para a extração, os tecidos foram homogeneizados com água ultra pura, e posteriormente realizou-se a adição de 300 µL de hidróxido de cálcio (CHS) e 150 µL de sulfato cúprico (CSR), e o produto foi agitado em vórtex e congelado. Em seguida as amostras foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante foi reservado. Ácido sulfúrico concentrado foi adicionado às amostras, com posterior congelamento. Após ser descongelado e centrifugado, o sobrenadante final foi acondicionado em vial. A quantificação das concentrações dos ácidos graxos foi então realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em

cromatógrafo SHIMADZU (SHIMADZU do Brasil, São Paulo-SP), acoplado ao detector por índice de refração (RID), modelo RID-20A. Para as análises foi utilizada a coluna HPX 87H (Aminex®) (300mm x 7,8mm) e pré coluna de mesma fase (Bio-Rad Laboratórios Brasil, Rio de Janeiro-RJ), fluxo da corrida 0,7 mL/minuto, duração da corrida de 25 min, e temperatura do forno de 45°C. O volume injetado foi de 20 µL e a fase móvel utilizada foi água acidificada (0,005 M de ácido sulfúrico). A obtenção dos dados foi realizada através do software Lab Solutions, Shimadzu Corporation (2013), de acordo com a curva padrão dos ácidos acético, propiônico e butírico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os dados foram expressos em µmol/g de fezes.

4.7 Análise histológica do cólon da prole de ratas wistar

Os tecidos intestinais foram fixados em formol e previamente preparados para análise histopatológica. Os tecidos do cólon fixados em formol foram desidratados, embebidos em parafina e fatiados em seções de 4 µm. Para cada animal foram preparadas lâminas com cinco cortes não consecutivos. As seções foram hidratadas e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram visualizadas com ampliação de 10x com um microscópio óptico (Leica Microsystems). Para a realização da análise morfométrica foram obtidas fotografias realizadas em microscópio acoplado à câmera digital por meio do Software cellSens. A análise da profundidade das criptas intestinais foi feita através do programa ImageJ (Versão 1.47, Wayne Rasband/National Institute of Health, USA), com medidas de no mínimo 20 criptas para cada animal, sendo quatro medidas de cada um dos cinco cortes (SOEST *et al.*, 2022).

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), também usado para design gráfico. A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos, as comparações de médias entre os grupos foram determinadas pela análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de

Newman-Keuls. Para significância estatística, foi adotado o $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A análise estatística também foi realizada nos dados da MI e da microbiota do leite. A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar as diferenças de alfa diversidade entre os grupos das amostras de microbiota foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. Para testar as diferenças na composição da comunidade microbiana (PCoA), foi utilizada a análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) nas distâncias UNIFRAC.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do estado nutricional da prole de ratas wistar

Tanto ao longo dos 21 dias quanto ao desmame, os filhotes dos grupos SL e KSL apresentaram maior ganho de peso em comparação aos grupos NL e KNL ($p < 0,05$) (Figura 9).

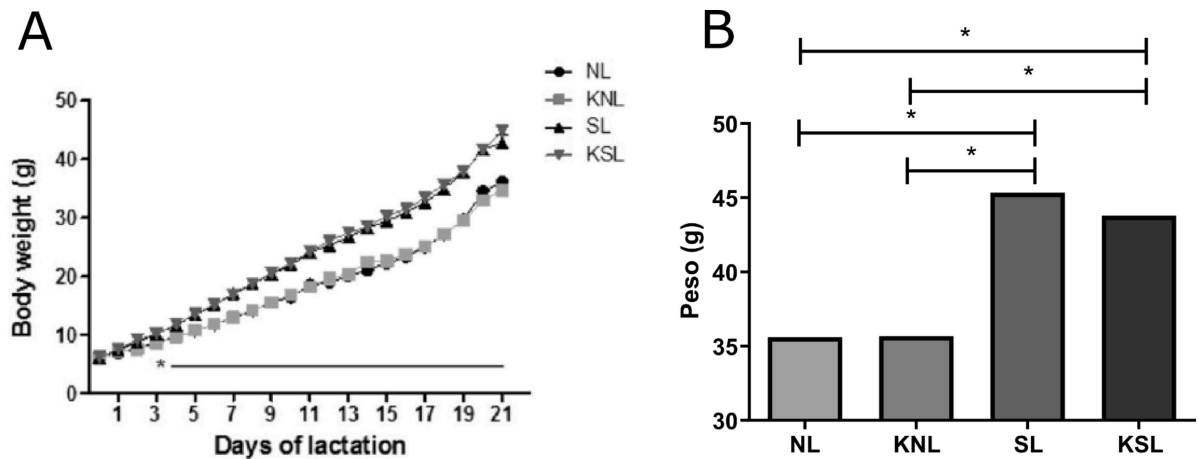


Figura 9. Peso dos animais ao longo de 21 dias (A) e aos 21 dias de idade (B). Resultados analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls ($*p < 0.05$). Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

5.2 Caracterização da microbiota do leite materno

O sequenciamento das amostras de DNA extraídas do leite materno resultou em 997.827 sequências de alta qualidade com uma média de 49.891 sequências por amostra. As leituras foram agrupadas em 9705 ASVs.

A diversidade e riqueza da microbiota do leite das mães foram avaliadas. Tanto a riqueza de ASVs (índice de Chao) quanto a diversidade (índice de Shannon), não apresentaram diferenças significativas, apesar da dispersão dos dados entre os grupos (Figura 11).

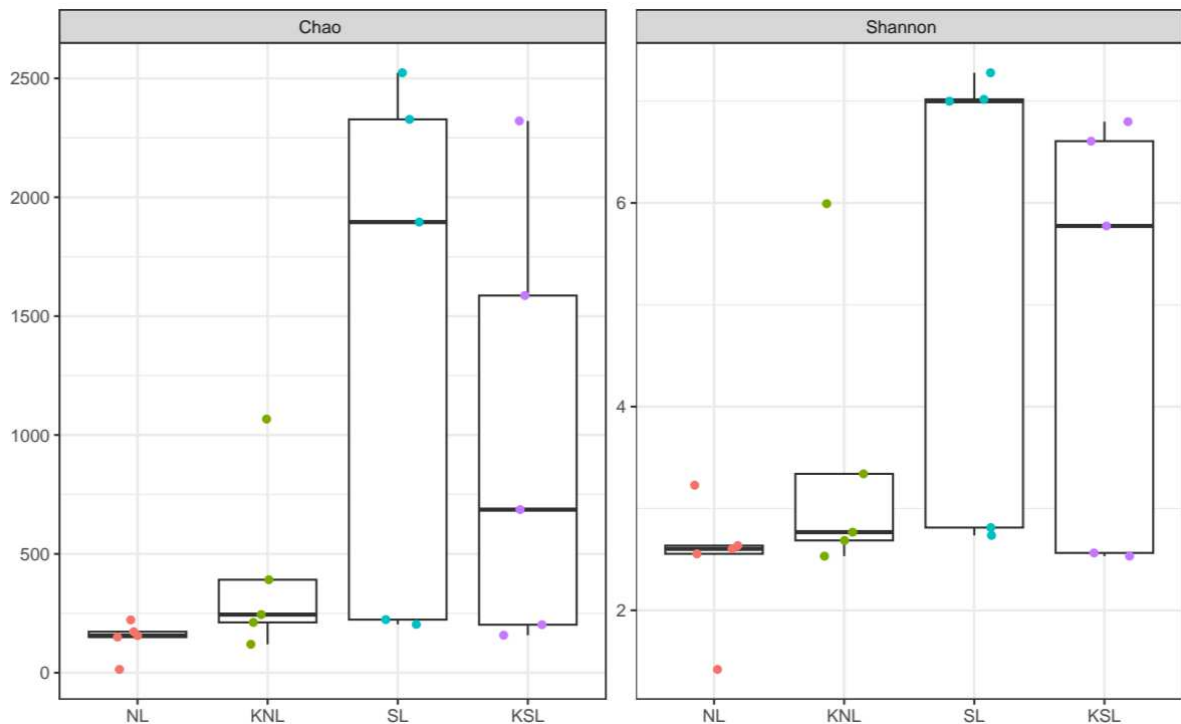


Figura 10. Riqueza e diversidade estimadas pelos índices de Chao e Shannon, respectivamente. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL). A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

Os filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteriota dominaram a microbiota do leite materno, como mostrado na Figura 12. Os filos Firmicutes e Actinobacteriota foram mais prevalentes nas mães cujas as ninhadas foram reduzidas (SL e KSL), enquanto o filo Proteobacteria foi mais prevalente nos grupos com a ninhada normal (NL e KNL), apesar da variação observada dentro dos mesmos grupos (Figura 13).

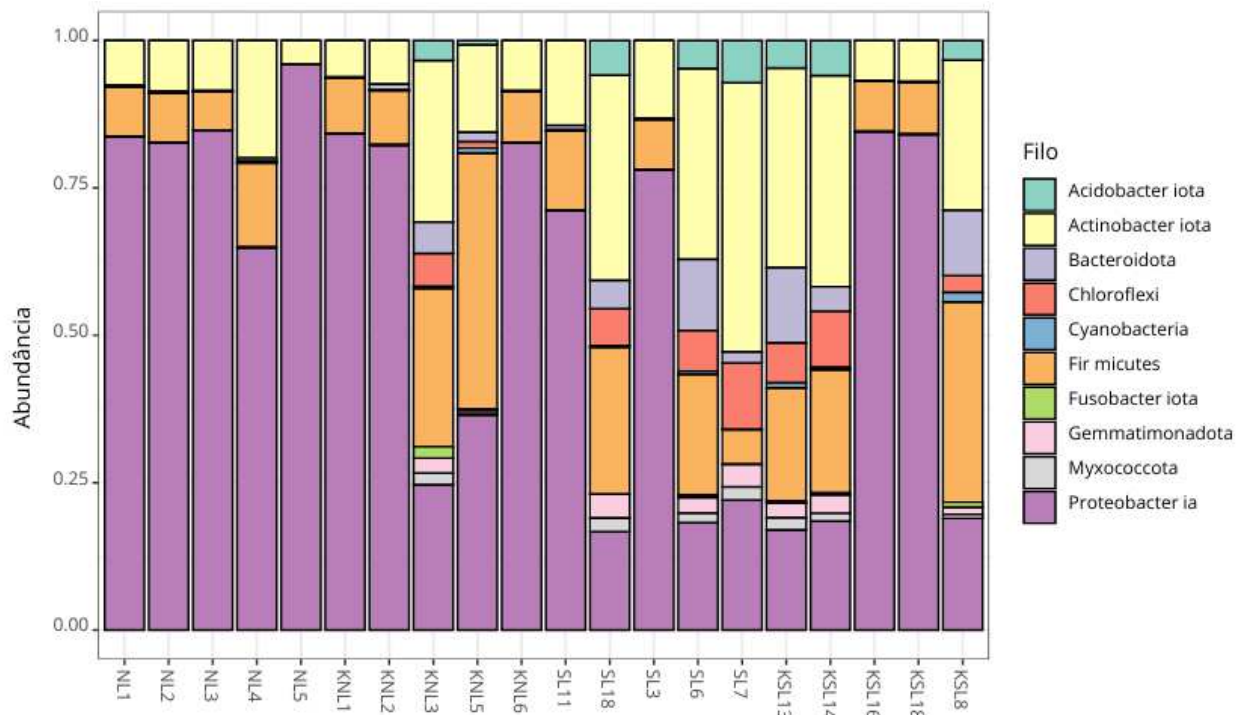


Figura 11. Gráfico de barras das abundâncias relativas dos filos bacterianos mais abundantes na microbiota do leite em cada amostra. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

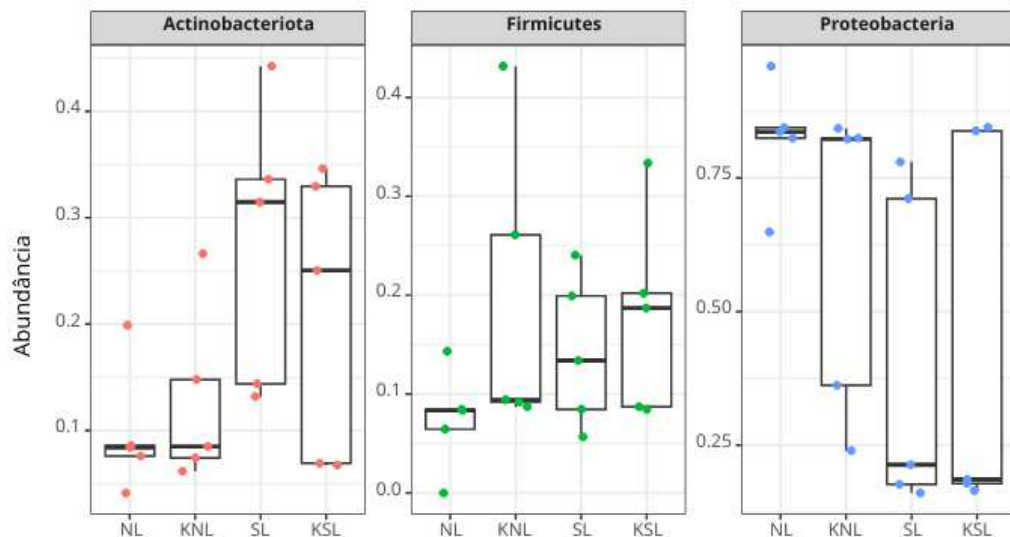


Figura 12. Abundâncias relativas de filos bacterianos na microbiota do leite de cada grupo. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL). A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

Diferenças significativas em ASVs entre os grupos NL e SL foram observadas pela análise de abundância diferencial usando DESeq2 ($p < 0,05$). A composição microbiana do leite materno analisada par a par entre esses grupos, em nível de gênero, é apresentada na figura 14. O grupo SL apresentou enriquecimento dos gêneros *Streptococcus*, *Sphingomonas*, *Skermanella*, *Microvirga*, *Bradyrhizobium*, *Streptomyces* e *Mycobacterium*, em relação ao grupo NL. A análise par a par entre os outros grupos não apresentou diferenças significativas.

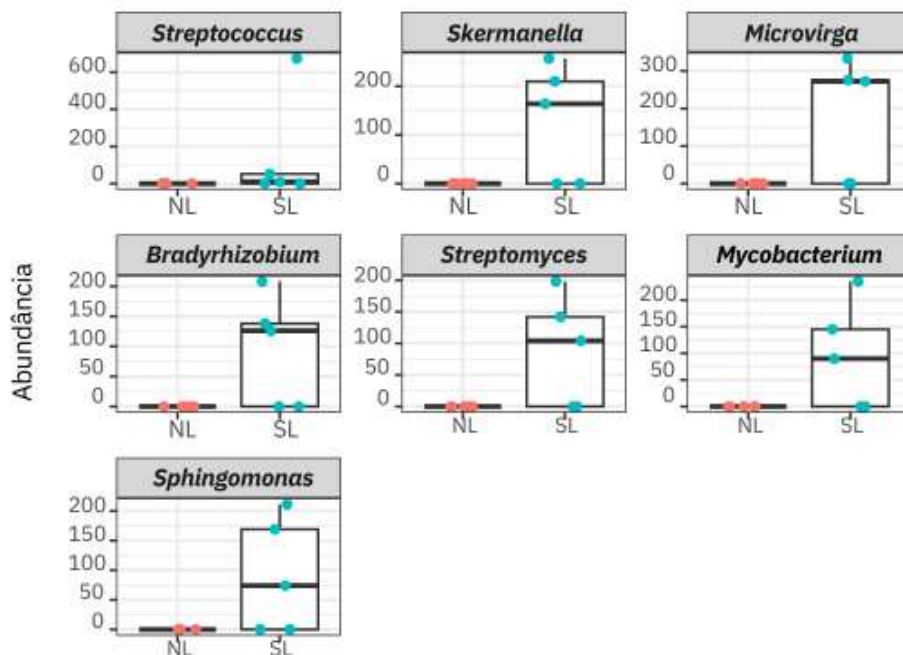


Figura 13. Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana do leite materno no nível de gênero entre os grupos NL e SL. A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

5.3 Caracterização da microbiota do leite materno e da microbiota intestinal da prole

O sequenciamento das amostras de DNA extraídas do conteúdo cecal resultou em 950.961 sequências de alta qualidade com uma média de 50.051 sequências por amostra. As leituras foram agrupadas em 1919 ASVs. Curvas de rarefação individuais foram geradas para avaliar se a amostragem fornecia cobertura suficiente de ASVs para descrever a composição bacteriana de cada amostra com precisão (Figura 15).

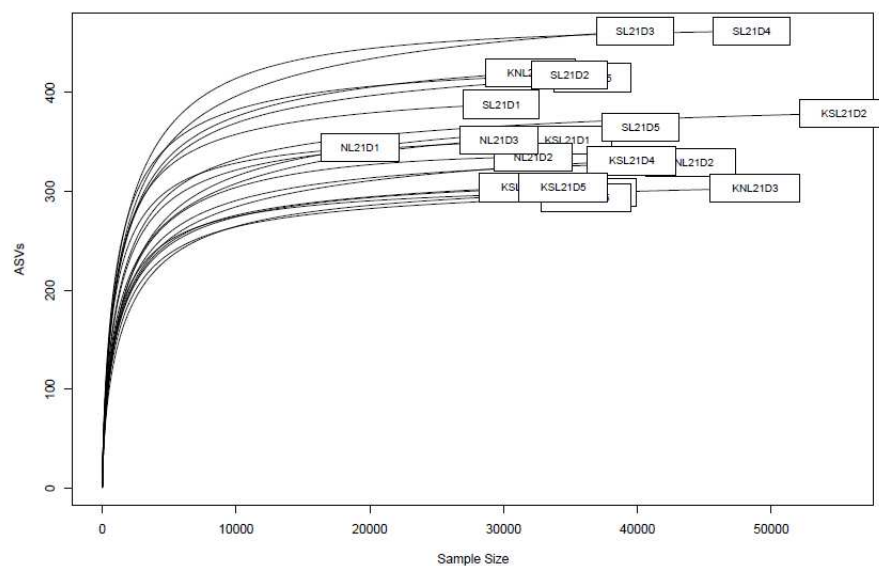


Figura 14. Curvas de rarefação geradas para cada amostra. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

A diversidade e riqueza de MI da progênie foram avaliadas. A riqueza de ASVs (Índice de Chao) foi maior no grupo SL, cujos filhotes foram superalimentados, em comparação aos dois grupos que receberam kefir de leite ($p < 0,05$) (Figura 16). A diversidade, medida pelo índice de Shannon, também foi maior no grupo SL e menor nos grupos que receberam kefir de leite, embora sem diferença significativa (Figura 17). Por outro lado, as estruturas gerais da comunidade microbiana (diversidade beta) diferiram significativamente ($r^2 = 0,47132$; $p = 0,004$ pelo teste ADONIS) entre os grupos, conforme mostrado no PCoA usando distância UniFrac ponderada e a representação dos centróides de *Cluster* (Figura 18). Além disso, é

possível notar que há uma tendência dos grupos que receberam kefir de leite estarem mais próximos entre si, embora o grupo SL seja mais heterogêneo.

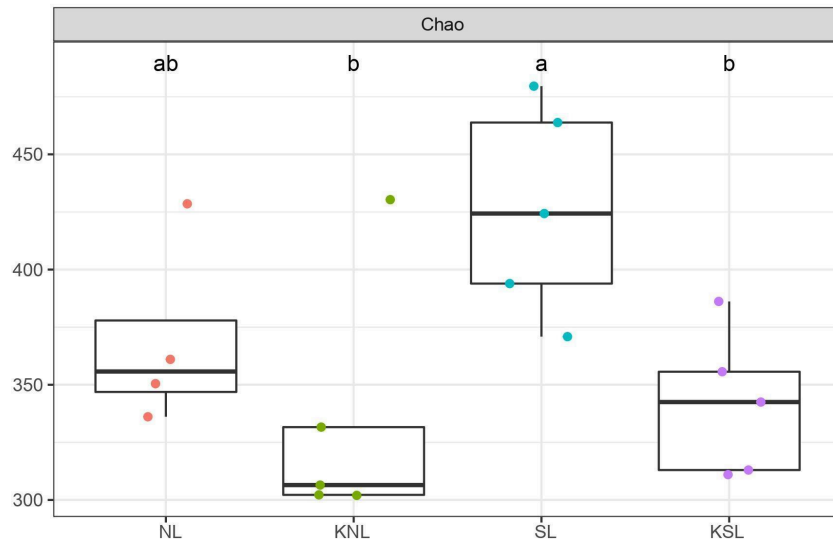


Figura 15. Riqueza estimada pelo índice de Chao. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL). A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

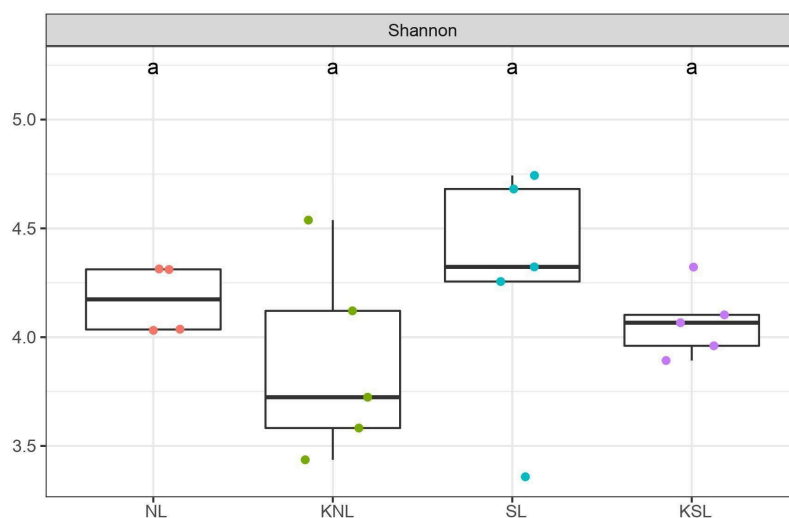


Figura 16. Diversidade alfa avaliada pelo índice de Shannon. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL). A variação entre as

amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

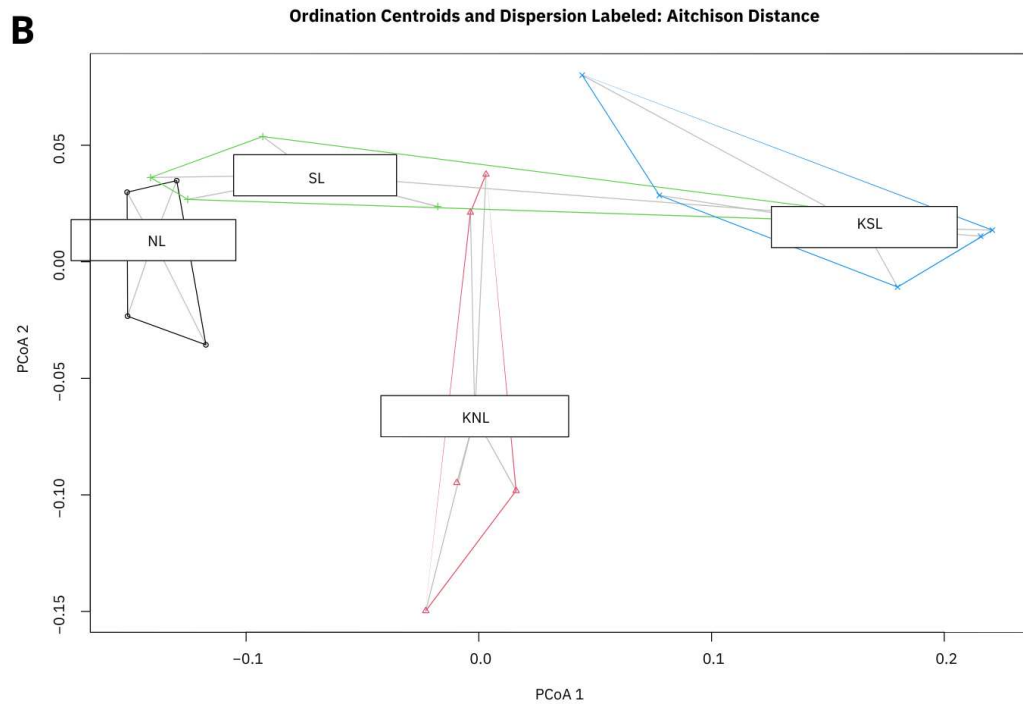
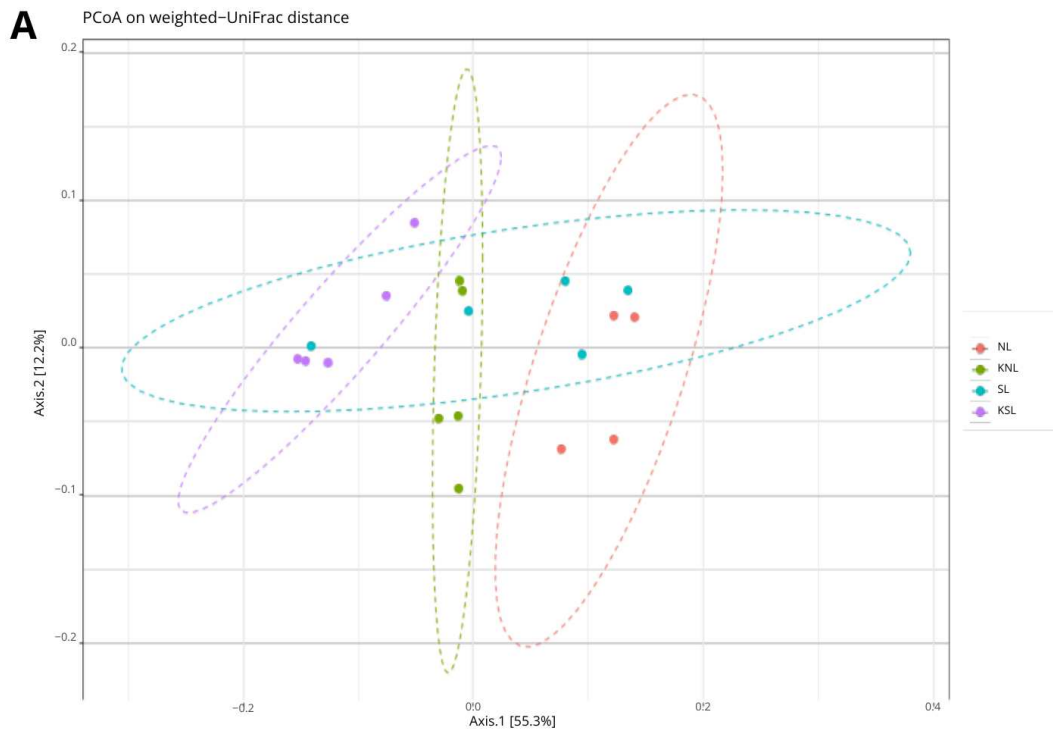


Figura 17. Análise de Coordenadas do Princípio da Diversidade Beta (PCoA) usando distância UniFrac ponderada destacando diferenças entre a comunidade microbiana ($p = 0,004$ pelo teste ADONIS) (A) e Centróides de ordenação e dispersão de amostras de *clusters* obtidos em PCoA usando distância UniFrac ponderada (B). Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

Os filos Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria e Campylobacterota foram os mais abundantes na MI dos animais (Figura 20). O filo Bacteroidota foi mais prevalente nos grupos que receberam kefir de leite (KNL e KSL), enquanto Firmicutes foi menos prevalente. A distribuição das ASVs pertencentes ao filo Proteobacteria não seguiu um padrão entre os grupos que receberam ou não kefir de leite (Figura 21).

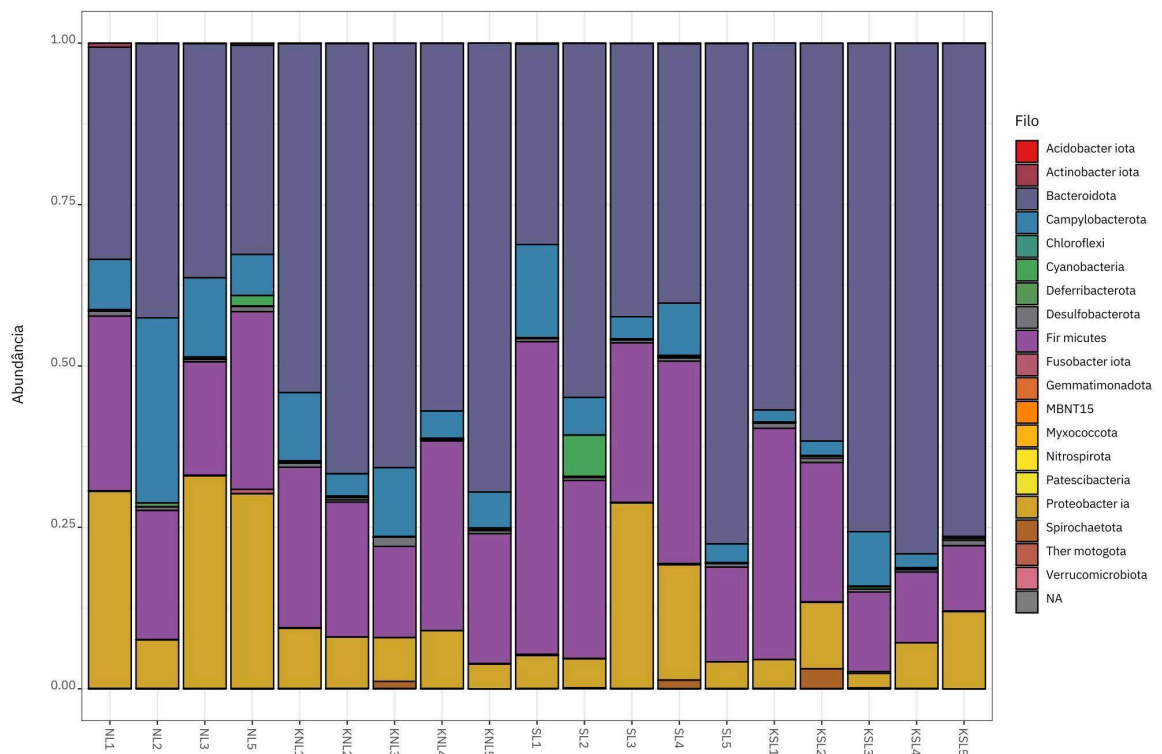


Figura 18. Gráfico de barras das abundâncias relativas dos filos bacterianos mais abundantes na microbiota intestinal de cada grupo: Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

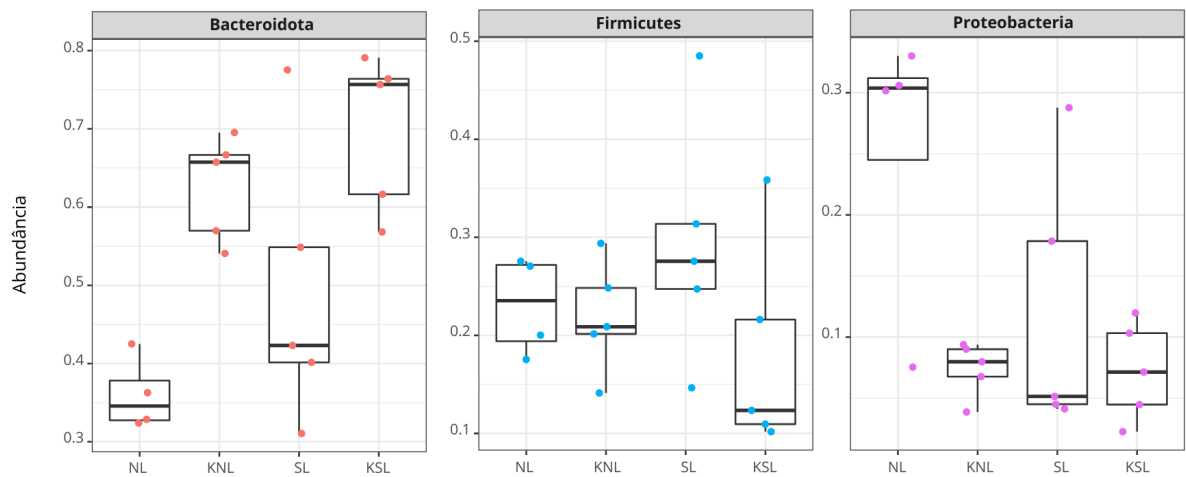


Figura 19. Abundâncias relativas dos filos bacterianos na microbiota intestinal de cada grupo: Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL). A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

Diferenças significativas em ASVs entre os grupos foram observadas pela análise de abundância diferencial usando DESeq2. A composição microbiana analisada par a par entre os grupos, em nível de gênero, é apresentada nas figuras 22, 23 e 24. Entre os grupos NL e SL (Figura 22), pode-se observar que houve enriquecimento do gênero *Prevotella* no grupo SL e do gênero *Lactococcus* e *Bacteroides* na MI dos animais do grupo NL. Entre os grupos NL e KNL (Figura 23), os gêneros *Lactobacillus* e *Bacteroides* foram mais abundantes no grupo que recebeu kefir de leite, e *Lachnoclostridium* e *Acinetobacter*, apesar de sua baixa abundância, foram mais prevalentes no grupo NL. Por fim, entre os grupos SL e KSL (Figura 24), os membros de *Prevotellaceae* foram detectados com maior frequência no grupo que recebeu kefir de leite, em comparação ao grupo que foi apenas superalimentado.

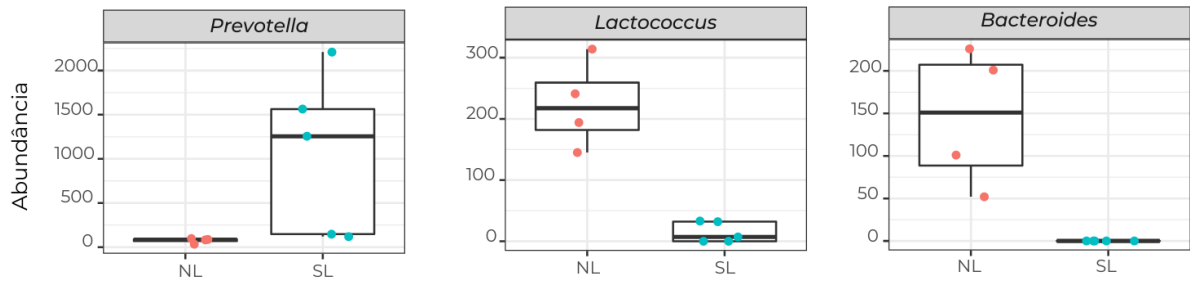


Figura 20. Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos NL e SL. A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

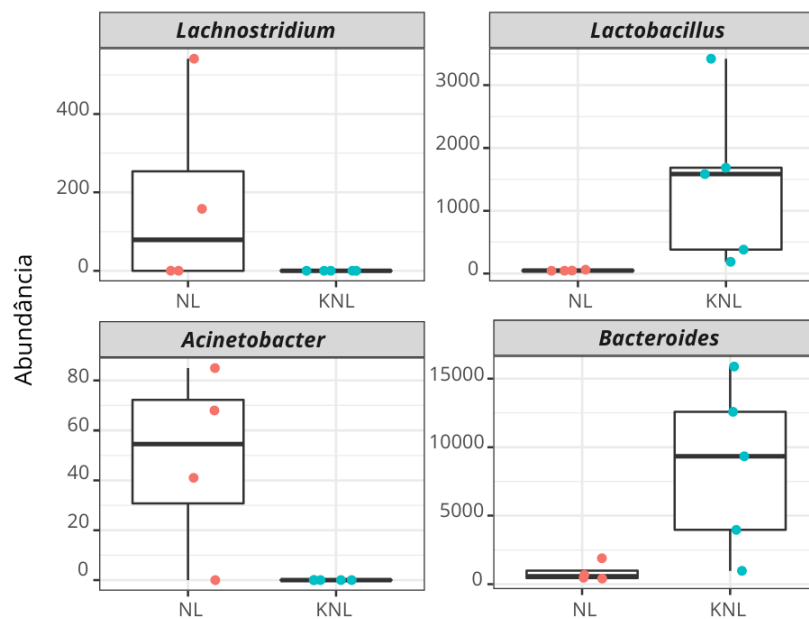


Figura 21. Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos NL e KNL. A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

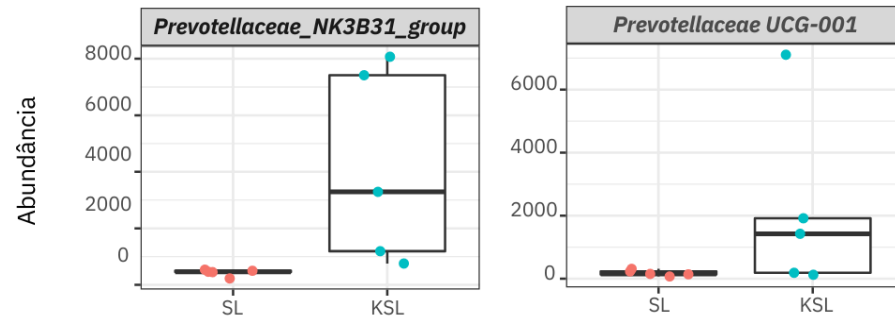


Figura 22. Análise de abundância diferencial usando DESeq2 da comunidade microbiana intestinal ao nível de gênero entre os grupos SL e KSL. A variação entre as amostras de cada grupo é apresentada como um *boxplot* mostrando os menores e maiores valores, os quartis de 25% e 75%, a mediana (linha central) e os valores discrepantes.

5.4 Concentração dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes da prole de ratas wistar

O AGCC mais abundante nas fezes do ceco da prole ao final da lactação foi o acetato ($62,18 \pm 5,09 \mu\text{mol/g}$), seguido por propionato ($32,2 \pm 4,81 \mu\text{mol/g}$) e butirato ($22,15 \pm 3,69 \mu\text{mol/g}$), nos quatro grupos. Os grupos que receberam kefir de leite (KNL e KSL) apresentaram maior concentração de butirato nas fezes, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Da mesma forma, o acetato foi mais abundante no grupo KSL e o propionato foi mais abundante no grupo NL, porém não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 25).

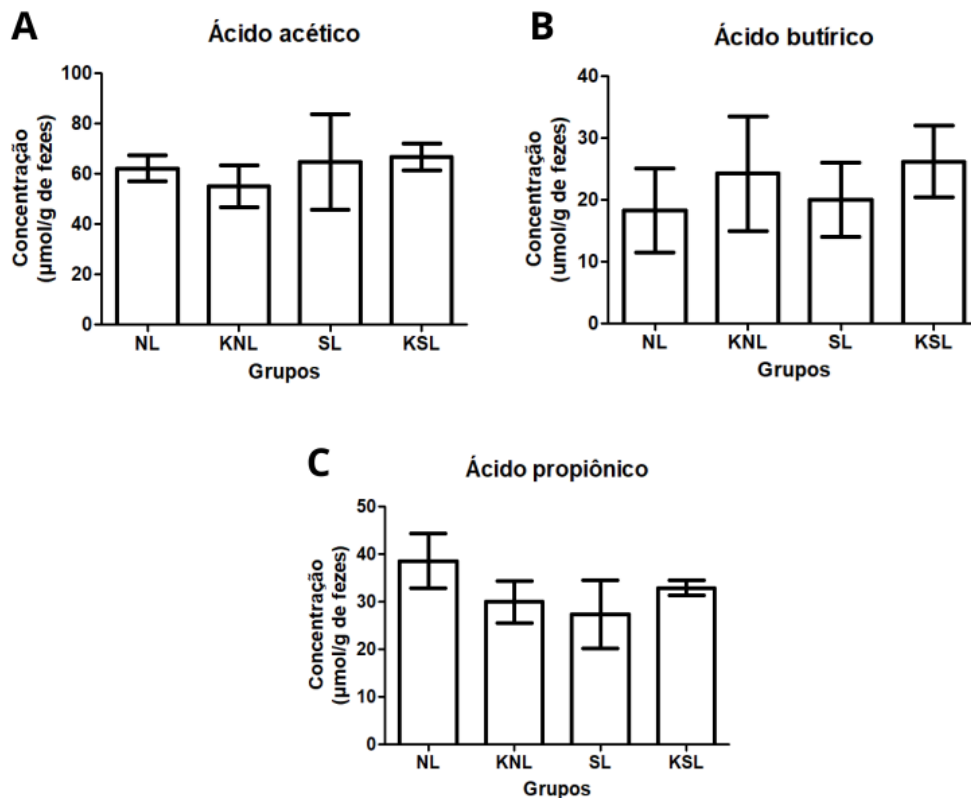


Figura 23. Concentração dos ácidos acético (A), butírico (B) e propiônico (C) em $\mu\text{mol/g}$ de fezes da prole de ratas Wistar. Normal litter (NL), Kefir normal litter (KNL), Small litter (SL) e Kefir small litter (KSL).

5.5 Análise histológica do cólon da prole de ratas wistar

A análise morfométrica das criptas intestinais revelou profundidade de cripta de $15,58 \pm 0,59 \mu\text{m}$ para amostras do grupo NL, $17,38 \pm 1,65 \mu\text{m}$ para o grupo KNL, $18,62 \pm 2,14 \mu\text{m}$ para o grupo SL e $18,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$ para o grupo KSL. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 26).

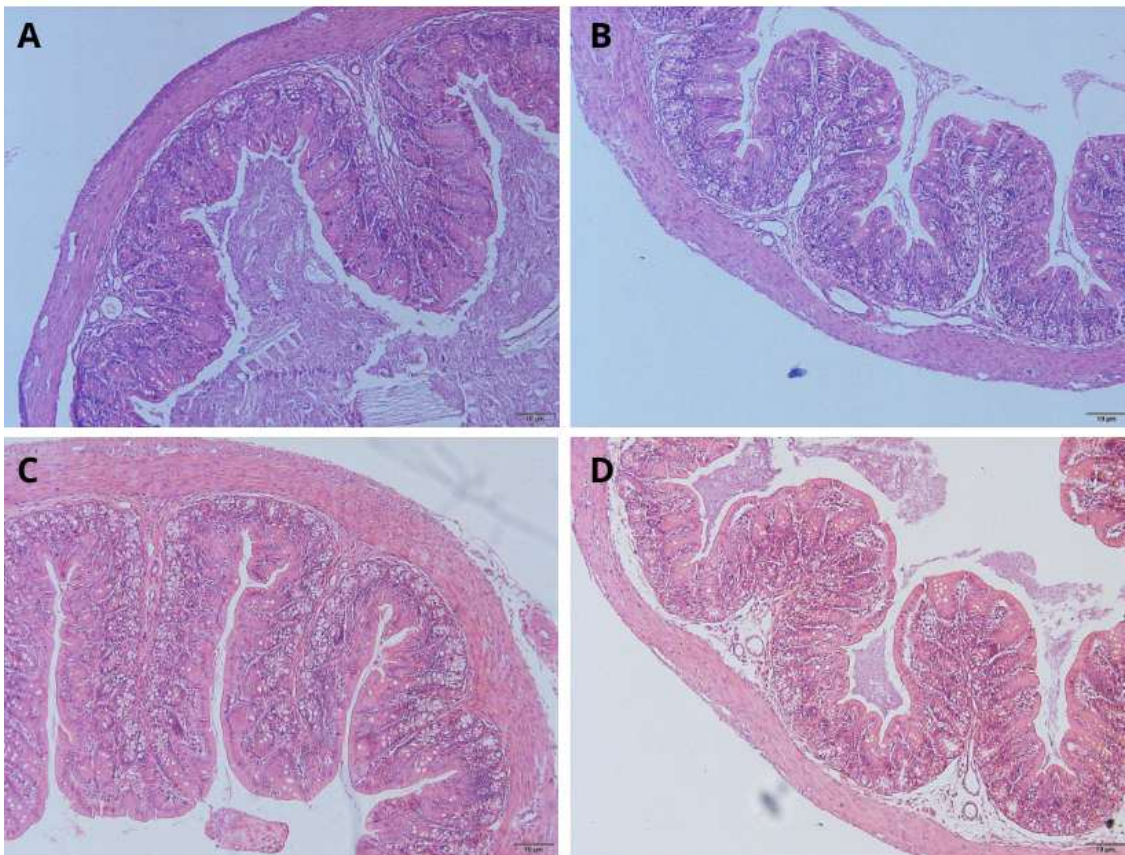


Figura 24. Histologia do cólon. Imagens representativas obtidas do cólon de ratos NL (A), KNL (B), SL (C) e KSL (D). Ampliação de 10x.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi mostrado pela primeira vez, que o consumo materno de kefir de leite durante a lactação é capaz de modular a MI da prole ao desmame, de forma diferenciada na prole superalimentada por redução de ninhada. Embora as concentrações de AGCC não tenham diferido significativamente entre os grupos, observou-se uma tendência de aumento de butirato entre os animais que receberam kefir de leite. Em vista do papel do butirato na fisiologia intestinal, esse aumento pode contribuir para a saúde intestinal futura desses animais, considerando que a lactação é um período fundamental para a colonização e plasticidade da MI.

De fato, os efeitos benéficos do kefir de leite, quando ingerido em períodos críticos do desenvolvimento, já foram demonstrados (PELUZIO *et al.*, 2021; AZIZI *et al.*, 2021; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016), sendo alguns pelo nosso grupo de pesquisa (BRASIEL *et al.*, 2022), que usando o mesmo modelo de superalimentação por redução de ninhada, foi encontrado que o consumo materno de kefir de leite durante a lactação e até a puberdade foi capaz de modular a MI da progênie adulta, e reverter alterações causadas pela superalimentação neonatal, tais como aumento do perfil inflamatório e da carcinogênese colorretal. Assim, considerando que a lactação é um período fundamental para colonização e estabelecimento da MI, este estudo foi idealizado, para compreender como o consumo de probiótico nesse período pode modificar a microbiota do leite materno e modular a MI da prole superalimentada por redução de ninhada.

O modelo de programação por superalimentação neonatal por redução do tamanho da ninhada já está bem estabelecido e tem sido usado para simular o cenário nutricional atual e o desenvolvimento de obesidade. Esse modelo leva ao aumento do consumo de leite materno pela prole que está em número reduzido, gerando ganho de peso corporal, aumento da adiposidade corporal e outras alterações metabólicas como hiperinsulinemia e aumento de estresse oxidativo (RODRIGUES *et al.*, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2013), além de perfil inflamatório e alterações na MI na vida adulta (BRASIEL *et al.*, 2022). Neste estudo os animais foram acompanhados até o desmame, e os resultados corroboram com os achados na literatura, já que as proles superalimentadas apresentaram maior peso corporal durante e ao final da lactação (GONZÁLEZ-HEDSTRÖM *et al.*, 2020; BRASIEL *et*

al., 2022; RODRIGUES *et al.*, 2022), e o consumo de kefir de leite não influenciou nesse ganho de peso corporal.

Em relação ao leite materno, não houve diferenças significativas em relação à riqueza e diversidade microbiana, apesar da dispersão dos dados entre os grupos. Os grupos de mães NL e SL se assemelham, já que não receberam a intervenção com o kefir de leite. Da mesma forma, os grupos KNL e KSL também se assemelham, pois as mães receberam o kefir de leite. Porém, cabe ressaltar que eles não podem ser considerados como sendo os mesmos grupos, pois a diferença na quantidade de filhotes sendo amamentados pode gerar alterações na composição do leite materno em relação aos macronutrientes, como já foi descrito na literatura (CONGIU *et al.*, 2019; SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

Foram observadas mudanças na composição da microbiota do leite em relação ao filo, sendo Proteobacteria, Actinobacteriota e Firmicutes os filos mais abundantes encontrados neste estudo, o que também foi observado em outros estudos (AZAGRA-BORONAT *et al.*, 2020; SANJULIÁN *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; LONDOÑO-SIERRA *et al.*, 2023; LATUGA; STUEBE; SEED, 2014). É possível notar que ocorre uma possível influência do tamanho da ninhada na composição da microbiota do leite materno. Não há relatos na literatura sobre mudanças na microbiota do leite materno em resposta a alterações no estímulo à lactação. No entanto, é possível que tais alterações ocorram, assim como acontece com a modificação da composição. Aqui, a composição centesimal do leite não foi avaliada, no entanto, seria pertinente examinar os oligossacarídeos do leite. Isso porque a redução na ninhada, capaz de influenciar a composição dos macronutrientes do leite por meio de mudanças na sucção, pode também ter impactado a quantidade de oligossacarídeos no leite materno. Dado que os oligossacarídeos possuem uma ação prebiótica reconhecida, servindo como substrato para a microbiota (TIAN *et al.*, 2023), a mudança em sua composição pode ter ocasionado uma modificação na microbiota do leite entre os grupos com ninhada reduzida e os grupos com tamanho normal de ninhada.

Não houve alteração da composição microbiológica do leite a partir da oferta de kefir de leite para as mães, o que contrasta com resultados previamente observados na literatura com a administração de probióticos durante a lactação (ZAIDI; MOORE; OKALA, 2021). Embora a literatura sugira que a microbiota do leite possa ser influenciada pela MI da mãe (TIAN *et al.*, 2023), neste estudo, o kefir de

leite pode ter modulado a MI da mãe, mas não foi suficiente para influenciar a microbiota do leite.

No grupo SL, uma maior abundância de ASVs de alguns gêneros bacterianos foi encontrada em comparação com o grupo NL. *Streptococcus* foi o gênero mais abundante em uma amostra do grupo SL. No entanto, nenhuma relação deste gênero com diferentes tamanhos de ninhada foi encontrada na literatura. Os gêneros *Skermanella* (ONORI *et al.*, 2018), *Microvirga* (MARIN-GÓMEZ *et al.*, 2020; BARDANZELLU *et al.*, 2018; DRAGO *et al.*, 2017; GRYAZNOVA *et al.*, 2021), *Mycobacterium* (NASER; SCHWARTZ; SHAFRAN, 2000), *Bradyrhizobium* (NOTARBARTOLO *et al.*, 2022), *Sphingomonas* (LI *et al.*, 2017; NOTARBARTOLO *et al.*, 2022; ŠTŠEPETOVA *et al.*, 2022) e *Streptomyces* (HE *et al.*, 2018), encontrados no leite materno do presente estudo, também foram encontrados no leite humano e de outros animais em outros estudos, porém, também sem relação com o tamanho da ninhada.

Em relação à MI, neste estudo, foi encontrada maior riqueza bacteriana no grupo SL, em contraste com a baixa riqueza bacteriana geralmente encontrada em indivíduos com obesidade (CHATELIER *et al.*, 2013; COTILLARD *et al.*, 2013). De acordo com a análise de diversidade beta, os grupos que receberam kefir de leite pareciam ter uma microbiota mais semelhante, o que também foi observado nos grupos que não receberam kefir de leite, mostrando que o consumo de kefir de leite por ratas lactantes influenciou a MI da prole.

Também foram observadas mudanças na composição da MI. O grupo SL apresentou maior abundância do filo Firmicutes e menor abundância do filo Bacteroidota, o que corrobora com os achados da literatura. Em geral, aumento no filo Firmicutes em comparação com o filo Bacteroidota está associado ao aumento da ingestão de alimentos e maior risco de obesidade (FRANKLIN; ERICSSON, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2022; ANGELAKIS *et al.*, 2012; CHATELIER *et al.*, 2013). Os grupos que receberam kefir de leite (KNL e KSL) apresentaram um aumento considerável na abundância do filo Bacteroidota que, ao contrário de Firmicutes e Proteobacteria, protege contra a obesidade e os efeitos da inflamação (RODRIGUES *et al.*, 2022; MACHATE *et al.*, 2020).

No grupo NL, em relação ao SL, foi encontrada uma maior abundância de ASVs nos gêneros bacterianos *Bacteroides* e *Lactococcus*, e no grupo SL, um enriquecimento de ASVs no gênero *Prevotella*. *Bacteroides* podem ter um papel

principal nos estágios iniciais da colonização intestinal dos recém-nascidos, aparecendo aproximadamente 10 dias após o nascimento e os filhotes amamentados não apresentam números significativos de *Bacteroides* até serem desmamados (GOPALAKRISHNA; HAND, 2020; MACKIE, SGHIR; GASKINS, 1999; WEXLER, 2007; TOSCANO *et al.*, 2017), que é o período avaliado no presente estudo. Da mesma forma, o gênero *Lactococcus*, que pertence ao grupo de BAL, também foi encontrado em menor número, mas prevaleceu no grupo NL em relação ao SL. Em outros estudos, foi encontrado no colostro (BERGMANN *et al.*, 2014) e na microbiota da prole, via leite materno (de ANDRÉS *et al.*, 2017). Espera-se que a MI dos animais controle seja mais saudável do que a dos animais superalimentados, pois estes apresentam aumento de peso corporal ao desmame e alterações endócrino-metabólicas que podem afetar a MI, favorecendo bactérias potencialmente patogênicas (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). Assim, o fato de haver maior abundância de *Lactococcus* no grupo NL poderia ser um fator de proteção para esses animais controle, que não apresentam essas alterações endócrino-metabólicas características do modelo de superalimentação neonatal. O gênero *Prevotella* tem ação pró-inflamatória e costuma estar em baixo número em indivíduos com estado de saúde adequado (WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021). Alguns estudos mostram a presença desse gênero prevalecendo em indivíduos com obesidade e em doenças com algum grau de inflamação (PINART *et al.*, 2021; UEBANSO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Já foi relatado que no modelo de redução do tamanho da ninhada, os animais apresentam maior gordura corporal antes mesmo do desmame e na idade adulta, com maior risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). O gênero *Prevotella* foi mais abundante nos animais do grupo SL em relação ao grupo NL, o que pode já ser o início dessa alteração na MI dos animais superalimentados.

No grupo KNL, um grande número de ASVs do gênero bacteriano *Bacteroides* foi encontrado em comparação com o grupo NL. Em um estudo anterior, a microbiota do leite fermentado usado para tratar esses animais foi analisada, e o gênero *Bacteroides* estava presente (BRASIEL *et al.*, 2021). Assim, é possível que os animais KNL tenham recebido maior quantidade dessas bactérias via leite materno durante a lactação. O mesmo pode ser dito sobre os *Lactobacillus*, que foram encontrados em maior quantidade no grupo KNL do que no grupo NL e também

estavam presentes no leite fermentado usado para alimentar os animais. Existem também estudos em animais e humanos que mostram que *Lactobacillus* ingeridos pela mãe durante o período de lactação foram capazes de colonizar o intestino da prole (PADILHA *et al.*, 2019; SINDI *et al.*, 2021; BRASIEL *et al.*, 2022; MORALES-FERRÉ *et al.*, 2021). Por outro lado, o grupo NL apresentou mais ASVs dos gêneros *Lachnospirillum* e *Acinetobacter* do que o grupo que recebeu kefir de leite (KNL), porém, o número absoluto de ASVs encontrado desses gêneros foi pequeno, o que provavelmente não tem relevância biológica.

Foi encontrada uma grande quantidade de ASVs de *Prevotellaceae_NK3B31_group* e *Prevotellaceae_UCG-001* em animais do grupo KSL, em comparação com o grupo SL. Enquanto alguns membros de *Prevotellaceae* têm ação pró-inflamatória (WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021), outros desempenham um papel positivo na homeostase da glicose e na produção de AGCC (WU *et al.*, 2021; PINTO *et al.*, 2023). *Prevotellaceae_NK3B31_group* é um gênero bacteriano associado à fermentação de carboidratos e produção de AGCC, que são fontes de energia para os enterócitos. Assim, esse grupo pode promover respostas anti-inflamatórias e, por outro lado, a ausência de AGCC pode levar ao comprometimento da função da barreira intestinal (HUANG *et al.*, 2021; JIANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021). É importante ressaltar que o grupo *Prevotellaceae_NK3B31_group* também foi encontrado no leite fermentado usado para tratar os animais (BRASIEL *et al.*, 2021). Dessa forma, sugere-se que esse grupo pode ter alcançado e se estabelecido no intestino da prole através do leite materno.

Como já mencionado, a MI é responsável pela produção de AGCC no cólon e no presente estudo, os AGCC mais abundantes foram os ácidos acético e propiônico, seguidos pelo ácido butírico, o que também foi visto em outros estudos (JIANG *et al.*, 2020; MACHATE *et al.*, 2020; TOPPING; CLIFTON, 2001; ŁONIEWSKI *et al.*, 2022; NOGAL; VALDES; MENNI, 2021; SCHWAB, 2022). As concentrações de AGCC no intestino oscilam ao longo da vida, o que está relacionado com alterações na composição da MI, que também varia com o tempo (FUSCO *et al.*, 2023; SCHWAB, 2022). As principais bactérias produtoras de AGCC são *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Coprococcus* e *Clostridium spp* (ŁONIEWSKI *et al.*, 2022; WAITZBERG; ROCHA; ALMEIDA, 2021).

Destas, apenas *Prevotella spp.* e *Bacteroides spp.* foram encontradas na análise da MI da prole no presente estudo, nos grupos SL e KNL, respectivamente. A concentração de AGCC nos grupos onde esses gêneros foram identificados não foi acentuada, mostrando que eles não foram capazes de produzir AGCC a ponto de se diferenciar significativamente dos outros grupos. Jiang *et al.* (2020) mostraram que o gênero *Prevotellaceae-NK3B31* foi positivamente associado com a concentração de ácido acético, ácido propiônico e AGCC totais no intestino. Aqui, o grupo que mostrou maior abundância desse gênero (KSL) também demonstrou maiores concentrações dos ácidos acético e butírico, porém sem diferença significativa. A ausência de bactérias envolvidas na produção de AGCC no intestino da prole, somada ao curto período de tempo da análise (21 dias) destaca a importância de uma análise criteriosa do intervalo em que o estudo foi realizado. Este curto período de tempo pode explicar a ausência de diferenças observáveis nos padrões de AGCC, visto que processos metabólicos complexos e interações microbiota-hospedeiro podem demandar um período mais extenso para se manifestarem de maneira perceptível.

Alterações histológicas na vida adulta foram observadas em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, onde as mães foram suplementadas com kefir de leite durante o período de lactação e até a puberdade (BRASIEL *et al.*, 2022). Os filhotes foram avaliados aos 240 dias de idade, proporcionando uma análise aprofundada do impacto a longo prazo da intervenção com kefir de leite. Além disso, os animais foram submetidos à indução de câncer colorretal, o que permitiu a investigação dos efeitos do kefir de leite em um cenário mais complexo, relacionado à patogênese do câncer colorretal. Sendo assim, é importante reconhecer que a indução do câncer colorretal introduz uma complexidade adicional, podendo influenciar as respostas observadas. Aqui, a homogeneidade morfológica identificada sugere estabilidade na arquitetura das criptas intestinais sob as diferentes condições experimentais, indicando também que o kefir de leite não provocou alterações negativas. No entanto, é importante ressaltar que o período aqui avaliado foi de apenas 21 dias e os efeitos que ocorrem a longo prazo podem não ter sido totalmente capturados nesse intervalo. Embora modificações importantes tenham sido obtidas na MI da prole nesse período de tempo, é importante reconhecer que certas respostas e efeitos podem se manifestar de maneira mais pronunciada ou tornar-se mais discerníveis ao longo de períodos mais

extensos. Assim, os resultados desta análise sugerem a necessidade de investigações mais abrangentes e de longo prazo para a compreensão completa dos efeitos do kefir de leite na saúde intestinal da prole.

7 CONCLUSÃO

- As proles superalimentadas apresentaram aumento de peso corporal durante e ao final da lactação, e o consumo de kefir de leite não teve impacto significativo nesse ganho de peso.
- A oferta de kefir de leite para as mães não foi capaz de alterar a composição da microbiota do leite e foi observada possível influência do tamanho da ninhada na composição da microbiota.
- A administração materna de kefir de leite durante a lactação resultou em modificações na MI em relação aos filos e gêneros bacterianos, sendo uma possível estratégia para modular a MI dos filhotes amamentados.
- O consumo de kefir de leite não ocasionou mudanças significativas nas concentrações de AGCC no período de 21 dias, embora tenha sido observada maior presença de butirato nas proles dos grupos que ingeriram kefir de leite.
- O kefir de leite não foi capaz de alterar a arquitetura das criptas intestinais, que se mantiveram preservadas ao final da lactação.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram explorados os efeitos da superalimentação neonatal e do consumo materno de kefir de leite durante a lactação na microbiota e saúde intestinal de ratos. Foi observado que a administração materna de kefir de leite durante a lactação resultou em modificações na MI, alterando sua composição ao final de 21 dias, principalmente considerando os filos Firmicutes e Bacteroidota. Esses achados mostram que o uso materno de kefir de leite durante esse período pode ser uma estratégia para modular a MI dos filhotes amamentados. Além disso, a análise da microbiota do leite materno revelou uma possível influência do tamanho da ninhada na sua composição microbiana. Nossos resultados mostraram que a análise em um curto período (21 dias), pode não capturar completamente os efeitos a longo prazo, sugerindo que para que os benefícios potenciais já demonstrados pelo kefir de leite sejam evidenciados na saúde do hospedeiro, a ingestão do mesmo deva ocorrer em período de tempo maior do que o avaliado no presente estudo. Neste contexto, estudos adicionais são necessários para elucidar completamente os benefícios do kefir de leite na microbiota e na saúde intestinal.

9 REFERÊNCIAS

- AGOSTI, M. *et al.* Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. **La Pediatria Medica e Chirurgica**, v. 39, n. 2, p. 157, 2017.
- ALMEIDA, T. C.; BRASIEL, P. G. A.; LUQUETTI, S. C. P. D. Kefir de leite mantém a contagem microbiológica com atividade probiótica ao longo do cultivo com predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Aspergillus*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 2, p. 80-91, 2022.
- ALVES, J. L. B. *et al.* Gut microbiota and probiotic intervention as a promising therapeutic for pregnant women with cardiometabolic disorders: Present and future directions. **Pharmacological Research**, v. 145, p. 104252, 2019.
- ANGELAKIS, E. *et al.* The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 91–109, 2012.
- ARGENTE-ARIZÓN, P. *et al.* Age and sex dependent effects of early overnutrition on metabolic parameters and the role of neonatal androgens. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 26, p. 1-17, 2016.
- AZAGRA-BORONAT, I. *et al.* Associations of Breast Milk Microbiota, Immune Factors, and Fatty Acids in the Rat Mother–Offspring Pair. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 319, 2020.
- AZIZI, N. F. *et al.* Kefir and Its Biological Activities. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021.
- BARDANZELLU, F. *et al.* Human Breast Milk: Exploring the Linking Ring Among Emerging Components. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, p. 215, 2018.
- BARKER, D. J. *et al.* Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, p. 938-941, 1993.
- BARKER, D. J. Obesity and early life. **Obesity Reviews**, v. 8, p. 45-49, 2007.
- BENGOA, A. A. *et al.* Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686-700, 2018.
- BERGMANN, H. *et al.* Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 7, p. 1119–1128, 2014.
- BEZIRTOGLOU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173–177, 1997.
- BOURRIE, B. C. T.; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 647, 2016.

BRASIEL, P. G. A. *et al.* Maintenance of Probiotic Characteristics of Dry Kefir: Is It Possible? **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 20, n. 5, p. 463–472, 2020.

BRASIEL, P. G. A. *et al.* Microbial community dynamics of fermented kefir beverages changes over time. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 2, p. 324–331, 2021.

BRASIEL, P. G. A. *et al.* Kefir modulates gut microbiota and reduces DMH-associated colorectal cancer via regulation of intestinal inflammation in adulthood offsprings programmed by neonatal overfeeding. **Food Research International**, v. 152, p. 110708, 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, Apresenta as 20 alegações de propriedades funcionais aprovadas pela ANVISA. Atualizado em Julho 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, 2003.

CAETANO, D. R.; MONTANHINI, M. T. M. Análise microbiológica de leite fermentado kefir produzido com leite contaminado por *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 33-38, 2014.

CALATAYUD, M.; KOREN, O.; COLLADO, M. C. Maternal Microbiome and Metabolic Health Program Microbiome Development and Health of the Offspring. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 10, p. 735-744, 2019.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARASI, P. *et al.* Safety Characterization and Antimicrobial Properties of Kefir-Isolated Lactobacillus kefir. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

CARASI, P. *et al.* Impact of kefir derived Lactobacillus kefir on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

CEVIKBAS, A. *et al.* Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 2, p. 78-82, 1994.

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

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Milk and Milk Products. 2. ed. Roma: World Health Organization (WHO); Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 248 p., 2011.

COLLADO, Y. L. *et al.* Effectiveness of inulin intake on indicators of chronic constipation; a meta-analysis of controlled randomized clinical trials. **Nutrición Hospitalaria**, v. 30, n. 2, p. 244–252, 2014.

COLLDEN, G. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 15-24, 2015.

CONCEIÇÃO, E. P. S. *et al.* Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition — role of insulin resistance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 81-87, 2013.

CONGIU, M. *et al.* Breast Milk for Preterm Multiples: More Proteins, Less Lactose. **Twin Research and Human Genetics**, v. 22, n. 4, p. 265-271, 2019.

COTILLARD, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585–588, 2013.

DE ANDRÉS, J. *et al.* Physiological Translocation of Lactic Acid Bacteria during Pregnancy Contributes to the Composition of the Milk Microbiota in Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 14, 2017.

DE VRESE, M.; KELLER, B.; BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial betagalactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **British Journal of Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 67-75, 1992.

DIAS, P. A. *et al.* Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

DIMIDI, E. *et al.* Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1806, 2019.

DOI, M.; USUI, N.; SHIMADA, S. Prenatal Environment and Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, n. 13, p. 860110, 2022.

DRAGO, L. *et al.* Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. **The ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 875-884, 2017.

EDWARDS, C. A. Determinants and Duration of Impact of Early Gut Bacterial Colonization. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, p. 246-250, 2017.

FAO/OMS. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85, Roma, 2006.

FRANCO, J. G. *et al.* Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5503-18, nov. 2012.

FRANKLIN, C. L.; ERICSSON, A. C. Microbiota and reproducibility of rodent models. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 114–122, 2017.

FUSCO, W. *et al.* Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 15, n. 9, p. 2211, 2023.

GAMBA, R. R. *et al.* Chemical, microbiological, and functional characterization of kefir produced from cow's milk and soy milk. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

GONZÁLEZ-HEDSTRÖM, D. *et al.* Overfeeding during Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 549, 2020.

GOPALAKRISHNA, K. P.; HAND, T. W. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 823, 2020.

GRECH, A. *et al.* Maternal exposures and the infant gut microbiome: a systematic review with meta-analysis. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-30, 2021.

GRYAZNOVA, M. V. *et al.* Microbiota of Cow's Milk with Udder Pathologies. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1974, 2021.

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

GUO, Z. *et al.* Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 11, p. 844-850, 2011.

HE, F. *et al.* Metagenomic analysis revealed the effects of goat milk feeding and breast feeding on the gut microbiome of Amur tiger cubs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 4, p. 2590-2596, 2018.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, p. 582-587, 2003.

HOCHBERG, Z. *et al.* Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 2, p. 159-224, 2011.

HONG, W. S. *et al.* The antiallergic effect of kefir lactobacilli. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. H244-H253, 2010.

HUANG, P. *et al.* NMN Maintains Intestinal Homeostasis by Regulating the Gut Microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 714604, 2021.

HUANG, T. *et al.* Effect of breast milk with or without bacteria on infant gut microbiota. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 22, n. 1, p. 595, 2022.

HSU, C-N.; TAIN, Y-L. The Good, the Bad, and the Ugly of Pregnancy Nutrients and Developmental Programming of Adult Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 894, 2019.

IBBA, M. P.; ELASKY, K. Basic and practical microbiology lab manual, 1. ed, Cognella, 2019.

JIANG, X. *et al.* The Microbiome–Metabolome Response in the Colon of Piglets Under the Status of Weaning Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2055, 2020.

KOLETZKO, B. *et al.* Nutrition During Pregnancy, Lactation and Early Childhood and its Implications for Maternal and Long-Term Child Health: The Early Nutrition Project Recommendations. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 93–106, 2019.

KORPELA, K. *et al.* Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 182, 2018.

LATUGA, M. S.; STUEBE, A.; SEED, P. C. A review of the source and function of microbiota in breast milk. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 32, n. 1, p. 68-73, 2014.

LEE, M. Y. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, n. 8, p. 647-654, 2007.

LEITE, A. M. O. *et al.* Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LENOIR, M. *et al.* *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 9, p. 862–873, 2016.

LI, S-W. *et al.* Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 965, 2017.

LI, Y. *et al.* The Effect of Breast Milk Microbiota on the Composition of Infant Gut Microbiota: A Cohort Study. **Nutrients**, v. 14, n. 24, p. 5397, 2022.

LIU, J. R. *et al.* Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002.

LIU, J-R *et al.* Antioxidative activities of kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 4, p. 567- 573, 2005.

LONDOÑO-SIERRA, D. C. *et al.* Maternal diet may modulate breast milk microbiota - a case study in a group of colombian women. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1812, 2023.

LONG, N.M. *et al.* Maternal obesity in sheep increases fatty acid synthesis, upregulates nutrient transporters, and increases adiposity in adult male offspring after a feeding challenge. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

ŁONIEWSKI, I. *et al.* Breastfeeding Affects Concentration of Faecal Short Chain Fatty Acids During the First Year of Life: Results of the Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Nutrition**, v. 11, n. 9, p. 939194, 2022.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

MACHATE, D. J. *et al.* Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4093, 2020.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1035s–1045s, 1999.

MAGALHÃES, K. T. Caracterização microbiológica e química da bebida kefir de leite e açúcar mascavo. 2008. 108 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MAIA, L. A. *et al.* Bone structure and strength are enhanced in rats programmed by early overfeeding. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 4, p. 259-268, 2014.

MARIN-GÓMEZ, W. *et al.* Changes in the Bacterial Diversity of Human Milk during Late Lactation Period (Weeks 21 to 48). **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1184, 2020.

MARQUINA, D. *et al.* Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136-140, 2002.

MARTÍNEZ-OCA, P. *et al.* Maternal Diet Determines Milk Microbiome Composition and Offspring Gut Colonization in Wistar Rats. **Nutrients**, v. 15, n. 20, p. 4322, 2023.

MARTÍN-PELÁEZ, S. *et al.* The Impact of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics during Pregnancy or Lactation on the Intestinal Microbiota of Children Born by Cesarean Section: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 14, n. 2, p. 341, 2022.

MCMILLEN, I.C.; ADAM, C.L.; MÜHLHÄUSLER, B.S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of Physiology**, v. 565, p. 9-17, 2005.

McMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MILANI, C. *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, p. e00036-17, 2017.

MOHAJERI, M. H. *et al.* The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 1-14, 2018.

MORALES-FERRÉ, C. *et al.* Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 2975, 2021.

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

NASER, S. A.; SCHWARTZ, D.; SHAFRAN, I. Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis From Breast Milk of Crohn's Disease Patients. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 4, p. 1094-1095, 2000.

NOGAL, A.; VALDES, A. M.; MENNI, C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-24, 2021.

NOTARBARTOLO, V. *et al.* Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 194-210, 2022.

OKSANEN, J. *et al.* Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-6, 2019.

OLIVEIRA, V. A. Ácidos graxos de cadeia curta, produtos do metabolismo da microbiota intestinal, protegem da lesão renal aguda. 2014. 86 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

ONORI, R. *et al.* First isolation of Skermanella aerolata from a human sample. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, n. 6, p. 552-553, 2018.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54–59, 2003.

PADILHA, M. *et al.* The Human Milk Microbiota is Modulated by Maternal Diet. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 502, 2019.

PAUL, H. A. *et al.* Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. **Scientific Reports**, v. 12, n. 6, p. 20683, 2016.

PELUZIO, M. C. G. *et al.* Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 638740, 2021.

PENKLER, M. *et al.* DOHaD in science and society: emergent opportunities and novel responsibilities. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 3, p. 268-273, 2019.

PEREZ-MUÑOZ, M. E. *et al.* A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 48, 2017.

PICÓ, C. *et al.* Lactation as a programming window for metabolic syndrome. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 5, p. e13482, 2021.

PINART, M. *et al.* Gut Microbiome Composition in Obese and Non-Obese Persons: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 12, 2021.

PINTO, Y. *et al.* Gestational diabetes is driven by microbiota-induced inflammation months before diagnosis. **Gut**, v. 72, n. 5, p. 918–928, 2023.

PORTINCASA, P. *et al.* Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1105, 2022.

PRUESSE, E. *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

R CORE TEAM. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>

RAMIREZ, V. *et al.* Lactation Plays a Fundamental Role in Developmental Programming. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 21, n. 10, p. 1817-1829, 2021.

RAMOS-ROMAN, M. A. Breast Milk: A Postnatal Link Between Maternal Life Choices and the Prevention of Childhood Obesity. **Clinical Therapeutics**, v. 40, n. 10, p. 1655-1658, 2018.

RAUTAVA, S. Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 1, p. 5–14, 2016.

RODRIGUES, K. L. *et al.* Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

RODRIGUES, A. L. *et al.* Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic – pituitary – thyroid axis of young and adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 587, p. 2647-2661, 2009.

RODRIGUES, V. S. T. *et al.* The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: An explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. **Physiological Reports**, v. 10, n. 3, p. e15191, 2022.

RODRIGUEZ, J.M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 26050, 2015.

RODRÍGUEZ-GONZÁLES, G. L. *et al.* Importance of the lactation period in developmental programming in rodents. **Nutrition Reviews**, v. 78, p. 32-47, 2020.

ROSA, D. D. *et al.* Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82–96, 2017.

ROSENFELD, C. S. Homage to the ‘H’ in developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 1, p. 8–29, 2017.

SANJULIÁN, L. *et al.* Bacterial Diversity of Breast Milk in Healthy Spanish Women: Evolution from Birth to Five Years Postpartum. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2414, 2021.

SCHLIEP, K. P. phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592–593, 2011.

SCHWAB, C. The development of human gut microbiota fermentation capacity during the first year of life. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 2865-2874, 2022.

SEKAR, R.; WANG, L.; CHOW, B. K. C. Central Control of Feeding Behavior by the Secretin, PACAP, and Glucagon Family of Peptides. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 18, 2017.

SIEGFRIED, V. R. *et al.* Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaft Forsch**, 1984.

SINDI, A. S. *et al.* Can we modulate the breastfed infant gut microbiota through maternal diet? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 5, 2021.

SOEST, B. V. *et al.* Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 8, p. 7011-7022, 2022.

- SOLOMONS, N. W. Developmental origins of health and disease: concepts, caveats, and consequences for public health nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. Suppl 1:S12-6, 2009.
- SONG, L. *et al.* Maternal Treatment with Metformin Persistently Ameliorates High-Fat Diet-Induced Metabolic Symptoms and Modulates Gut Microbiota in Rat Offspring. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3612, 2022.
- SOUZA, L. L.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring. **Nutrients**, v. 14, n. 10, p. 2045, 2022.
- SPENCER, S. J. Early life programming of obesity: the impact of the perinatal environment on the development of obesity and metabolic dysfunction in the offspring. **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2012.
- ŠTŠEPETOVA, J. *et al.* Maternal breast milk microbiota and immune markers in relation to subsequent development of celiac disease in offspring. **Scientific Reports**, v. 12, p. 6607, 2022.
- TAIN, Y-L.; HSU, C. N. Maternal High-Fat Diet and Offspring Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8179, 2022.
- TANG, M.; MARROQUIN, E. The role of the gut microbiome in the intergenerational transmission of the obesity phenotype: A narrative review. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1057424, 2022.
- TEJERA-MUÑOZ, A. *et al.* Postnatal Overfeeding during Lactation Induces Endothelial Dysfunction and Cardiac Insulin Resistance in Adult Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14443, 2023.
- THRIENE, K.; MICHELS, K. B. Human Gut Microbiota Plasticity throughout the Life Course. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 2, p. 1463, 2023.
- TIAN, M. *et al.* Maternal microbe-specific modulation of the offspring microbiome and development during pregnancy and lactation. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, p. 2206505, 2023.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1031-1064, 2001.
- TOSCANO, M. *et al.* Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- UEBANSO, T. *et al.* Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 756, 2017.

- VIEIRA, A. M. *et al.* Maternal soybean diet during lactation alters breast milk composition and programs the lipid profile in adult male rat offspring. **Endocrine**, v. 60, n. 2, p. 272–281, 2018.
- VINDEROLA, C. G. *et al.* Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 195-202, 2005.
- WAITZBERG, D. L.; ROCHA, R. M.; ALMEIDA, A. H. Microbiota Gastrointestinal: da disbiose ao tratamento. 1. ed. Atheneu, 2021.
- WANG, X. *et al.* Gut microbiota was modulated by moxibustion stimulation in rats with irritable bowel syndrome. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 63, 2018.
- WANG, T. *et al.* Lactobacillus plantarum PFM 105 Promotes Intestinal Development Through Modulation of Gut Microbiota in Weaning Piglets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- WANG, K. *et al.* Maternal Probiotic or Synbiotic Supplementation Modulates Jejunal and Colonic Antioxidant Capacity, Mitochondrial Function, and Microbial Abundance in Bama Mini-piglets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–14, 2021.
- WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007.
- WICKHAM H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. 2. ed., 260 p, 2016.
- WILLIAMS, L. *et al.* Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 3, p. 507-519, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Milk and Milk Products**. 2. ed. Roma, 2011.
- WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. **R Journal**, v. 8, p. 352-359, 2016.
- WU, W.-Y. *et al.* Silicon-containing water intake confers antioxidant effect, gastrointestinal protection, and gut microbiota modulation in the rodents. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0248508, 2021.
- YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of Lactococcus lactis ssp. Lactis strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 124-134, 2019.
- YU, H-R. *et al.* Effects of Maternal Gut Microbiota-Targeted Therapy on the Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Dams and Fetuses, Related to a Prenatal High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 4004, 2022.

ZAIDI, A. Z.; MOORE, S. E.; OKALA, S. G. Impact of Maternal Nutritional Supplementation during Pregnancy and Lactation on the Infant Gut or Breast milk Microbiota: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1137, 2021.

ZHENG, Y. *et al.* Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from Tibetan kefir grains. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.

ZHOU, L; XIAO, X. The role of gut microbiota in the effects of maternal obesity during pregnancy on offspring metabolism. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. BSR20171234, 2018.

ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 21/2016 – CEUA sobre “Avaliação dos efeitos do consumo materno de kefir na lactação sobre a microbiota intestinal, parâmetros metabólicos, inflamatórios e susceptibilidade à carcinogênese colorretal na progênie adulta de ratos *Wistar*, programados pela superalimentação neonatal” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de SHEILA CRISTINA POTENTE DUTRA LUQUETTI com a colaboração de ANA PAULA BORONI MOREIRA, ALINE DE AGUIAR NEMER, NATHÉRCIA PERCEGONI, EDUARDA KINGMA e MAÍRA SCHUCHTER FERREIRA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/12/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 10 mães (90 dias) com ninhadas de 2 dias de 10 machos cada e 26 mães (90 dias) com ninhada de 2 dias de 3 machos cada de ratos *Wistar* totalizando 214 animais, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2017 a 01/01/2019.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 21/2016 – CEUA about “Avaliação dos efeitos do consumo materno de kefir na lactação sobre a microbiota intestinal, parâmetros metabólicos, inflamatórios e susceptibilidade à carcinogênese colorretal na progênie adulta de ratos *Wistar*, programados pela superalimentação neonatal” under responsibility of SHEILA CRISTINA POTENTE DUTRA LUQUETTI and collaboration of ANA PAULA BORONI MOREIRA, ALINE DE AGUIAR NEMER, NATHÉRCIA PERCEGONI, EDUARDA KINGMA and MAÍRA SCHUCHTER FERREIRA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 06/12/2016. For the development of the research will be used 10 mothers (90 days) with 2-day litters of 10 males each and 26 mothers (90 days) with 2 days' litter of 3 males each of *Wistar* rats totalizing 214 animals, will be delivered as requested in the period of 01/01/2017 to 01/01/2019.

Juiz de Fora, 19 de dezembro de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA