

Juliana Lopez de Oliveira

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TRANS OU
OLIGOFRUTOSE, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NAS
MÃES E PROLE COM 90 DIAS DE VIDA SOBRE O METABOLISMO E
PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2016

Juliana Lopez de Oliveira

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TRANS OU
OLIGOFRUTOSE, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NAS
MÃES E PROLE COM 90 DIAS DE VIDA SOBRE O METABOLISMO E
PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Maria da Penha Oller do Nascimento

Coorientadora: Prof.^a Dra Luciana Pelegrini Pisani

Coorientadora: Prof.^a Dra. Lila Missae Oyama

São Paulo

2016

de Oliveira, Juliana Lopez

Efeito da suplementação de ácidos graxos trans ou oligofrutose, durante a gestação e lactação, nas mães e prole com noventa dias de vida sobre o metabolismo e parâmetros inflamatórios / Juliana Lopez de Oliveira. – São Paulo, 2016.

xviii, 125f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Nutrição.

Título em inglês: Effect of dietary intake of trans fatty acids or oligofructose supplementation during pregnancy and lactation on dams and offspring at 90 days-old on metabolism and inflammatory parameters.

1. Gordura Vegetal Hidrogenada, 2. Inflamação, 3. Oligofrutose, 4. Programação Metabólica, 5. Síndrome Metabólica

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia da Nutrição da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, sob a orientação da Prof^a. Dra. Claudia Maria da Penha Oller do Nascimento e coorientação das Prof^{as}. Dra. Lila Missae Oyama e Dra. Luciana Pelegrini Pisani durante o curso de Pós-graduação em Nutrição, com o auxílio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, do CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

“...Se tiverdes fé do tamanho de um grão de mostarda, direis a este monte: Passa daqui para acolá, e há de passar; e nada vos será impossível.” Mateus 17.20

DEDICATÓRIA

À Deus, que permitiu que esse trabalho fosse concluído, me deu Sua força e sabedoria infinitas.

Aos meus pais, Vilma e Joaquim, que me deram o bem mais precioso do mundo – a Vida! Muito obrigada pelo amor incondicional dedicado a mim, pela privilegiada educação que me deram e oportunidade de formação superior. Vocês são minha fonte inspiradora para concretização de mais esta conquista.

À meu irmão Rodrigo por sua amizade, compreensão e ajuda constante. Sem seu apoio não teria conseguido Rô.

À minha família a quem tenho profunda admiração e reconhecimento pelas lições de vida.

À quem não está mais entre nós, mas sei que ilumina meus dias, minha querida avó Elizabetha que sempre acreditou e torceu por mim, meu avós Gumercindo, Tereza e Benetido, os quais não conheci em vida, mas tenho profundo agradecimento.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oller do Nascimento por ter acreditado e confiado em mim. Obrigada pelo grande apoio, incentivo, paciência e confiança. Vou guardar sempre comigo todos os ensinamentos e exemplos de vida transmitidos.

À Prof.^a Dr.^a Luciana Pellegrini Pisani pela co-orientação. Obrigada pela confiança, carinho e grande apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Lila Missae Oyama, por todos os ensinamentos, pela grande disponibilidade e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Laís, minha querida amiga, por sua amizade, ajuda e apoio durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada Lá!

Às amigas e colegas de laboratório, que sempre me apoiaram e auxiliaram durante essa jornada, Aline Santamarina, Carina Moraes e Daniela Miranda.

Aos amigos que a vida me deu. Sempre estiveram presentes, não só nos momentos bons, mas principalmente quando mais precisei de apoio. Serei sempre grata! Muito obrigada Agnes Scaramuzzi, Débora Machado, Joffre Oliveira e Tatiana Carpanezi!

À Agnes Scaramuzzi por sua grande colaboração como revisora linguística.

Ao Mauro por todo apoio em meu projeto, sua responsabilidade e cuidados inigualáveis com os animais.

À Ana Lúcia que com sua alegria contagiante e pelo exemplo de vida. Muito obrigada por sua amizade.

Àqueles que contribuíram de alguma maneira durante o desenvolvimento desse trabalho: Edson Rabello de Abreu e Laerte Rosalem Jr.; Ana Claudia Losinskas pela participação nas fases iniciais de elaboração do projeto.

À todos os colegas e funcionários do laboratório por todo apoio e amizade todos os dias.

À CAPES, CNPQ e FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 1.....	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 2.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Programação metabólica.....	4
2.2 A influência da dieta materna na programação metabólica.....	5
2.2.1 O papel da composição de ácidos graxos da dieta materna.....	6
2.2.1 Efeitos da ingestão de ácidos graxos trans na gestação e lactação.....	8
2.3 O papel do intestino no desenvolvimento da síndrome metabólica.....	14
2.4 A ingestão de prébióticos na gestação e lactação.....	19
3 OBJETIVOS GERAIS.....	22
3.1 Objetivos Específicos.....	22
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Composição das dietas.....	25
4.3 Procedimento experimental.....	27
4.4 Conteúdo de gordura e proteína da carcaça.....	27
4.5 Análise da expressão proteica de IL-6R α , IL-10R α , AdipoR1, p-IK β α , p-NF κ B-p50 e p-NF κ B-p65 por Western Blotting.....	28
4.6 Dosagem de Citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 por ELISA.....	29
4.7 Análise dos níveis de DNA genômico para Lactobacillus spp.....	30
4.8 Análise dos níveis séricos de TNF- α	30
4.9 LPS, Ácidos Graxos Livres e Citocinas por ELISA.....	31

4.10 Análise bioquímica e hormonal.....	31
4.11 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6 SUMÁRIO DE CONCLUSÕES.....	105
7 CONCLUSÃO.....	108
8 REFERÊNCIAS.....	109
9 ANEXOS.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da síntese de moléculas pró e antiinflamatórias em tecido adiposo normal e tecido adiposo em obesidade.

Figura 2. Esquema representativo das cascatas de sinalização dos receptores TLR2 e TLR4, mediadas pelas vias dependentes e não dependentes de MyD88, relacionadas à inflamação e resistência à insulina presentes na obesidade e síndrome metabólica.

Figura 3. Representação esquemática dos efeitos da ingestão maternal de TFA durante a gestação e/ou lactação no desenvolvimento de doenças metabólicas no filho.

Figura 4. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais de ratas gestantes.

Figura 5. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais de filhotes, após desmame..

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas - AIN-93G e M

Tabela 2. Sequência de iniciadores diretos (*forward*) e reversos (*reverse*) usados em PCR *real time* para DNA genômico de bactérias

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 1

Table 1. Composition of the control diet and control diet supplemented with oligofructose according to AIN-93.

Table 2. Body composition and tissues weight of the dams

Table 3. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the dams and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon

Table 4. Body composition and tissues weight of the pups at 90 days of life

Table 5. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the C-C and OF-C group and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon

Figure 1. Body weight and dietary intake during pregnancy (A, C) and lactation period (B, D).

Figure 2. TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver.

Figure 3. Body weight (A), dietary intake (B), nose-to-anus length (C), Lee index (D) and metabolic efficiency (E) of 90 days/old offspring.

Figure 4. IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver.

Figure 5. IL-10R α (A), IL-6R α (B), Adipo-R1 (C), p-IKB α (D), p-NFkB-p50 (E) and p-NFkB-p65 (F) protein expression in soleus muscle.

Figure 6. IL-10R α (A), Adipo-R2 (B), p-NFkB-p50 (C), p-NFkB-p65(D) and p-IKB α (E) protein expression in liver.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 2

Table 1. Composition of the control diet, control diet supplemented with oligofructose and diet enriched with trans fatty acids according to AIN-93.

Table 2. Body composition and tissues weight of the dams

Table 3. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the dams and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon

Table 3. Body composition and tissues weight of the puppies

Table 4. Serum LPS, TNF- α , adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol in the offspring

Figure 1. Body weight gain and dietary intake during pregnancy (A, C) and lactation period (B, D).

Figure 2. TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver of dams.

Figure 3. Body weight, nose-to-anus length and Lee index of 90 days/old offspring.

Figure 5. Dietary intake and metabolic efficiency of 90 days/old offspring.

Figure 6. IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver.

Figure 7. IL-6R α (A), IL-10R α (B), Adipo-R1 (C), p-IKB α (D), p-NFkB-p50 (E) and p-NFkB-p65(F) protein expression in soleus muscle.

Figure 8. IL-10R α (A), Adipo-R2 (B), p-NFkB-p50 (C), p-NFkB-p65 (D) and p-IKB α (E) protein expression in liver.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
Adipo-R1	Receptor 1 para Adiponectina
Adipo-R2	Receptor 2 para Adiponectina
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGL	Ácidos Graxos Livres
AIN	American Institute of Nutrition
BSA	Albumina de Soro Bovino
C	Controle
CART	Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript
CCK	Colecistocinina
DHA	Ácido Graxo Docosaexaenóico
DTT	Ditiotreitol
EDL	Músculo Extensor Longo dos Dedos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EPA	Ácido Graxo Eicosapentaenóico
FOS	Frutooligossacarídeo
GH	Hormônio do Crescimento
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1
GLP-2	Peptídeo Semelhante ao Glucagon 2
GLUT-4	Isoforma 4 do Transportador de Glicose
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HDL	Lipoproteínas De Alta Densidade
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6 R α	Receptor de Interleucina 6 alfa
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRAK	Quinase Associada ao Receptor da IL-1
IRS-1	Substrato Do Receptor de Insulina 1
I κ B- α	Inibitor Do Fator De Transcrição Nuclear Kappa B Alfa
KOH	Hidróxido de Potássio

LC-PUFAs	Ácidos Graxos de Cadeia Longa Poliinsaturados
LDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MyD88	Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
OF	Oligofrutose
OXM	Oxintomodulina
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PCR	Proteína C Reativa
PCR-RT	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
p-NFκB-p50	Forma Fosforilada da Proteína p50 Fator Nuclear Kappa B
p-NFκB-p65	Forma Fosforilada da Proteína p65 Fator Nuclear Kappa B
POMC	Pró-Ópio-Melanocortina
PPAR-α	Receptor Alfa Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma
PUFA	Ácidos Graxos de Cadeia Longa Poliinsaturados
PYY	Peptídeo YY
RET	Tecido Adiposo Branco Retroperitoneal
TFA	Ácidos Graxos Trans
TLR	Receptor Toll-Like
TLR-4	Receptor Toll-Like 4
TNFR1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral Tipo 1
TNFR2	Receptor do Fator de Necrose Tumoral Tipo 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF	Fator Associado ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRAF-6	Fator 6 Associado ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada ao Trif
TRIF	Adaptador Contendo O Domínio TIR Induzindo Interferon-Beta
α-MSH	Hormônio Melanócito Estimulante Alfa

RESUMO

Introdução. Os efeitos adversos do consumo de ácidos graxos trans (TFA) foram amplamente estudados pela comunidade científica nas últimas décadas. Previamente, nosso grupo identificou que a ingestão de TFA durante a gestação e lactação promove um estado pró-inflamatório na prole aos vinte e um, bem como aos noventa dias de vida. Por outro lado, dados da literatura indicam que a ingestão os prebióticos podem alterar o ambiente intestinal e apresentar propriedades anti-inflamatórias. **Objetivo.** Avaliar o efeito de uma dieta suplementada com oligofrutose (OF 10%) ou de uma dieta rica em TFA (7%), durante a gestação e lactação, sobre parâmetros metabólicos e inflamatórios de ratas lactantes e da prole, com noventa dias de vida, no que concerne a endotoxemia, metabolismo e parâmetros inflamatórios. Adicionalmente, avaliar se a dieta suplementada com OF (10%) modifica esses parâmetros na prole, com noventa dias de vida, de mães que receberam dieta contendo TFA durante gestação e lactação. **Métodos.** No primeiro dia de gestação, as ratas foram divididas em três grupos: dieta controle (C), dieta controle suplementada com 10% de oligofrutose (OF) e dieta enriquecida com gordura vegetal hidrogenada, rica em TFA (T). As dietas foram mantidas durante a gestação e lactação. No vigésimo primeiro dia da lactação os animais foram desmamados e as mães eutanaziadas. Os filhotes foram mantidos em gaiolas individuais até noventa dias de vida quando foram eutanaziados. O sangue, intestino, tecido adiposo retroperitoneal (RET), tecido adiposo parametrial das mães e epididimal dos filhotes, fígado, tecidos musculares sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) foram coletados. O soro foi utilizado para a dosagem de lipopolissacarídeos (LPS), ácidos graxos livres (AGL), TNF- α , hormônios insulina, grelina, adiponectina e NPY, bem como de citocinas por meio de kits específicos. O fígado, RET e tecidos musculares sóleo e EDL, foram utilizados para determinação do conteúdo de citocinas por meio de kits específicos. O fígado e o tecido muscular sóleo foram colocados em tampão específico para realização de Western Blotting. O DNA genômico das bactérias presentes nas fezes do cólon foi determinado por PCR em tempo real. **Resultados.** A suplementação com 10% de oligofrutose durante a gestação e lactação: reduziu o ganho de peso corporal, ingestão dietética materna e

níveis séricos de adiponectina. Na prole com noventa dias de vida a suplementação materna de oligofrutose (10%) promoveu aumento do conteúdo de IL-6 e da expressão protéica de IL-6R, além de redução expressão protéica de Adipo-R1 no músculo sóleo. A ingestão materna de TFA promoveu aumento do Índice de Lee e da expressão protéica de p-NFkB-p65 na prole com noventa dias de vida. A suplementação da prole com oligofrutose (10%) promoveu redução do Índice de Lee e do conteúdo de IL-6 e TNF- α , acompanhado de uma maior expressão protéica de Adipo-R2 em fígado e DNA genômico de *Lactobacillus* spp. no cólon. **Conclusão.** A suplementação com 10% de oligofrutose durante a gestação e lactação promoveu um efeito pró-inflamatório nas mães e prole com noventa dias de vida, associados à diminuição adiponectina sérica materna, aumento do conteúdo de IL-6 e da expressão protéica de IL-6R, bem como a redução da expressão protéica de Adipo-R1 no músculo sóleo da prole com noventa dias de vida. Por outro lado, a suplementação da prole com oligofrutose (10%) reverteu o efeito obesogênico e pró-inflamatório exercido pelo consumo materno de ácidos graxos trans durante a gravidez e lactação, reduzindo Índice de Lee e o conteúdo de IL-6 e TNF- α , acompanhado de maior expressão protéica de Adipo-R2 em fígado. Juntos, estes resultados indicam que a suplementação com oligofrutose (10%) promove efeitos distintos em fases diferentes da vida.

Palavras Chave: 1.Gordura Vegetal Hidrogenada, 2.Inflamação, 3.Oligofrutose, 4.Programação Metabólica, 5.Síndrome Metabólica

ABSTRACT

Introduction. Adverse effects of the consumption of trans fatty acids (TFA) have been widely studied by the scientific community in the last. Previously, our group found that the intake of trans fatty acids (TFA) during pregnancy and lactation promotes a pro-inflammatory state in the offspring at twenty-one and ninety days old. Moreover, literature data indicates that the prebiotic intake may alter the intestinal environment, presenting antiinflammatory properties. To evaluate the effect of a diet supplemented with OF (10%) or a diet rich in TFA (7%) during gestation and lactation on metabolic parameters and inflammatory lactating rats and ninety days old offspring, concerning endotoxemia, metabolic and inflammatory parameters. In addition, to assess whether the diet supplemented with OF (10%) modifies these parameters in the offspring, ninety days old offspring, of mothers who received diet containing TFA during pregnancy and lactation. **Methods.** On the first day of pregnancy, the rats were divided into three groups: control diet (C) control diet supplemented with 10% oligofructose (OF) and diet enriched with hydrogenated fat rich in TFA (T). The diets were maintained during pregnancy and lactation. In the twenty-first day of lactation animals were weaned and mothers euthanized. The pups were kept in individual cages within ninety days of life and than euthanized. The blood, bowel, retroperitoneal adipose tissue (RET), parametrial fat mothers and epididymal of puppies, liver, soleus muscle tissues and EDL were collected. The serum was used for measuring lipopolysaccharide (LPS), free fatty acids (FFA), TNF- α , hormones, insulin, ghrelin, adiponectin and NPY as well as cytokines by specific kits. The liver, and soleus and EDL RET muscle tissue were used for determination of cytokine content by specific kits. The liver and soleus muscle tissue were placed in a specific buffer to perform Western blotting. Genomic DNA Bacteria present in the colon feces was determined by real time PCR. **Results.** Supplementation with 10% of oligofructose during pregnancy and lactation reduced body weight gain, maternal dietary intake and serum adiponectin levels. In ninety days old offspring, maternal supplementation of oligofructose (10%) promoted increased IL-6 content and protein expression of IL-6R, and reduced protein expression of ADIPO-R1 in the soleus muscle. Maternal intake of TFA increased Lee index and the protein expression of p-

*p65-NFkB in offspring with 90 days of life. Supplementation of offspring with oligofructose (10%) promoted reduction of Lee index and IL-6 and TNF- α content, accompanied by an increased protein expression of ADIPO-R2 in the liver and Lactobacillus spp. Genomic DNA in colon. **Conclusion.** Supplementation with 10% oligofructose during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in the mother and ninety days old offspring, associated with decreased maternal serum adiponectin, increased IL-6 content and protein expression of IL-6R as well as the reduction of protein expression ADIPO-R1 in the soleus muscle of ninety days old offspring. Moreover, supplementation of offspring oligofructose (10%) reversed the obesogenic and pro-inflammatory effect exerted by maternal consumption of trans fatty acids during pregnancy and lactation, thus reducing Lee index and IL-6 content and TNF- α , accompanied by an increased protein expression of ADIPO-R2 in the liver. Together, these results indicate that supplementation with oligofructose (10%) promotes different effects on different stages of life.*

Keywords: 1. Hydrogenated Vegetable Fat, 2. Inflammation 3. Oligofructose, 4. Metabolic programming, 5. Metabolic Syndrome

1 INTRODUÇÃO

A partir da década passada foram levantadas evidências no sentido de desvendar o papel do intestino e da microbiota intestinal no desenvolvimento de doenças crônicas, tais como, a obesidade. Padrões de modificações na proporção de bactérias intestinais relacionados às doenças metabólicas crônicas como a obesidade, foram aferidos por diversos pesquisadores embora, ainda não haja um consenso a respeito dessas proporções nas diversas fases da vida.^(21,22) Muitas evidências indicam que o aumento do conteúdo de bactérias probióticas, tais como, *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, estão relacionados à melhora na tolerância à glicose e no estado inflamatório.^(23,24) Evidências recentes na literatura indicam que o gênero *Lactobacillus spp.*, pertencente ao filo Firmicutes, apresenta efeitos benéficos relacionados ao controle do ganho de peso corporal e melhora da sensibilidade à insulina.^(22,25,26)

O intestino é considerado o maior órgão endócrino do organismo. No trato gastrointestinal são sintetizados uma série de peptídeos que exercem efeitos sobre a regulação da ingestão alimentar, por meio da comunicação entre o sistema nervoso entérico e o cérebro, tais como: peptídeo-YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP), peptídeo glucagon-símile 1 (GLP-1), oxintomodulina (OXM), colecistocinina (CCK) e grelina.⁽²⁷⁻²⁹⁾

Estratégias para modificar a composição bacteriana intestinal e/ou modular a síntese de peptídeos intestinais relacionados ao controle da ingestão alimentar têm sido constantemente estudadas, sendo a ingestão de fibras prebióticas uma delas. A oligofrutose, frutano do tipo inulina, é uma das fibras prebióticas mais estudadas atualmente. A suplementação com oligofrutose, promoveu modificações na composição da microbiota intestinal de ratos sob dieta alimentar rica em gordura, melhorando os parâmetros metabólicos da inflamação.⁽³⁰⁾ No entanto, previamente, demonstramos que o consumo materno de uma dieta suplementada com oligofrutose (10%), durante a gestação e lactação, exerceu um efeito pró-inflamatório decorrente de um aumento na endotoxemia.^(31,32)

Muitos autores verificaram que suplementação de fibras prebióticas do tipo inulina, em especial a oligofrutose, promove modificações na composição bacteriana

intestinal, exerce um papel importante no controle da ingestão alimentar, metabolismo glicêmico e inflamação.^(30,33-37) e, portanto, pode se tornar uma estratégia para promoção de efeitos protetores contra o desenvolvimento de obesidade e outras doenças metabólicas.

Por outro lado, também nas últimas décadas, os efeitos adversos do consumo de ácidos graxos trans (TFA) foram identificados em diversos estudos. Alguns desses efeitos deletérios são: aumento do LDL-colesterol, do estresse oxidativo e da produção de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α e proteína C-reativa), bem como uma diminuição do HDL-colesterol, promovendo excesso de peso corporal e o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas.⁽¹⁻³⁾ O consumo materno de ácidos graxos trans durante gestação e lactação pode exercer tais efeitos prejudiciais tanto para a gestante/lactante, quando para o seu filho.

O tipo de ácido graxo ingerido durante a gestação pela mãe pode afetar a quantidade e/ou a qualidade dos lipídios transferidos para o feto através da placenta, fato esse, que pode gerar efeitos sobre o desenvolvimento pós-natal.⁽¹²⁾ Em estudos anteriores verificamos que a ingestão materna de gordura vegetal hidrogenada, que é rica em ácidos graxos trans e saturados, durante a gestação e a lactação, promoveu na prole com vinte e um dias de vida um aumento: na quantidade de gordura da carcaça; na concentração sérica de triacilglicerol e colesterol; na expressão gênica de inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e TNF- α e na expressão protéica de TRAF-6 no tecido adiposo e, gerou também uma redução na concentração sérica de leptina e adiponectina; no mRNA de adiponectina e na expressão proteica de Adipo-R1 no tecido adiposo.^(13,14) Adicionalmente, detectamos na prole com noventa dias de vida uma elevação na expressão gênica de PAI-1 no tecido adiposo; na concentração sérica de endotoxinas, IL-6, TNF- α e IL1- β ; na expressão proteica de TLR4, NF κ Bp65 e MyD88 no hipotálamo e, ainda, uma redução de Adipo-R1 (receptor 1 de adiponectina), também no hipotálamo.^(15,16)

Esses resultados mostram que a ingestão materna de gordura vegetal hidrogenada durante a gestação e a lactação causa um estado pró-inflamatório que promove consequências metabólicas deletérias, semelhantes às observadas no quadro de obesidade. Nas últimas décadas, diversos autores reportam uma

correlação positiva entre o desenvolvimento de doenças metabólicas e a produção de citocinas pró-inflamatórias.⁽¹⁷⁻²⁰⁾

A primeira fase do desenvolvimento embrionário é, sem dúvida, um momento crucial na vida do homem, já que marcas epigenéticas individuais no genoma são definidas. Modificações na expressão de genes dirigidas por mecanismos epigenéticos desempenham um papel importante, não apenas no início do desenvolvimento, mas também na predisposição ao desenvolvimento de doenças no futuro.⁽⁴⁻⁶⁾ Diante disso, nas últimas décadas, pesquisadores se dedicaram ao estudo da “programação metabólica”.

O conceito de “programação metabólica” é referente a possíveis influências da nutrição materna, sejam elas benéficas ou adversas, que podem ocorrer tanto no feto, quanto no recém-nascido perdurando por toda a vida.^(7,8) A má nutrição materna durante esse período pode imprimir alterações permanentes na estrutura e função de órgãos chave, predispondo o indivíduo a desordens metabólicas na vida adulta, entre elas, o desenvolvimento de obesidade.⁽⁹⁻¹¹⁾

Desta forma, levantamos duas hipóteses:

1) a suplementação com OF a 10%, durante a gestação e lactação, elevará *Lactobacillus spp* na microbiota do intestino das mães, favorecendo o controle do ganho de peso gestacional, promovendo um estado anti-inflamatório materno e alterando o metabolismo da prole com noventa dias de vida com redução da endotoxemia e do estado pró-inflamatório;

2) a suplementação da prole com OF a 10% aumentará *Lactobacillus spp* na microbiota do intestino da prole com noventa dias de vida e reverterá o estado pró-inflamatório induzido pela ingestão materna de ácidos graxos trans, durante a gestação e lactação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Programação Metabólica

A vida fetal é considerada um momento crítico para o desenvolvimento de tecidos e órgãos do corpo, caracterizados por uma rápida divisão celular.⁽⁷⁾ A programação metabólica ou *imprinting* metabólico se refere ao impacto dos estímulos sofridos, nesse período crítico, que acarreta efeitos duradouros e persistentes ao longo da vida do indivíduo.^(10,38)

Um dos mais importantes estudos relacionados à influência das condições de nutrição materna durante a gestação no desenvolvimento de doenças foi a pesquisa denominada “*Dutch Famine*”, que verificou o impacto da má nutrição em mulheres, na Segunda Guerra Mundial, promovendo aumento da incidência de sobrepeso nos filhos homens na idade de serviço militar.⁽³⁹⁾

Diversos pesquisadores nas últimas décadas estudaram o impacto da nutrição inadequada durante a gestação e lactação, bem como os mecanismos pelos quais pode alterar um ou mais aspectos do desenvolvimento morfológico e fisiológico, aumentando a predisposição do indivíduo para desenvolvimento de doenças metabólicas, como a Diabetes Mellitus e problemas cardiometabólicos na vida adulta.^(5,40,41) O terceiro trimestre da gestação, por exemplo, é o período em que o feto atinge o crescimento máximo e, portanto, a má nutrição materna nesse período pode levar a várias respostas adaptativas, incluindo alterações no transporte de nutrientes pela placenta, resultando em perdas estruturais nos sistemas orgânicos em desenvolvimento.^(10,42,43)

Nos anos noventa, grupos de pesquisadores observaram que os desequilíbrios nutricionais no período de desenvolvimento fetal propiciam um fenótipo *thrifty* (poupador), propondo que o feto é capaz de se adaptar a um ambiente intrauterino adverso, no sentido de garantir sua sobrevivência, porém esse processo adaptativo levaria ao favorecimento metabólico de alguns órgãos chave em detrimento de outros, conferindo alterações persistentes no seu crescimento e função.⁽⁴⁴⁾ Pesquisadores relataram^(7,45,46), também nessa mesma década, que a nutrição materna inadequada promove alterações duradouras na pressão arterial,

metabolismo de colesterol, insulina e glicose, além de alterações relacionadas às funções endócrinas e imunes.

O grau de modificação na programação metabólica depende da carga genética e do período e intensidade da exposição aos fatores que influenciam essa programação, podendo a resposta ser diferenciada entre os indivíduos.^(17,45) A partir disso, diversos outros estudos passaram a ser realizados no sentido de desvendar os mecanismos e o impacto de diferentes tipos de dietas maternas no desenvolvimento fetal e programação metabólica.

2.2 A Influência da Dieta Materna na Programação Metabólica

A epigenética é o estudo das alterações herdadas da expressão gênica ao longo de diversas divisões celulares sem envolver alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Assim, ela é fundamentada em mudanças herdáveis e reversíveis na expressão gênica (silenciamento ou ativação da expressão de genes), tais como: a metilação do DNA ou alterações químicas de proteínas associadas (acetilação e metilação das histonas) e empacotamento da cromatina. Sendo que, enquanto a metilação do DNA parece estar relacionada com o silenciamento da expressão gênica, a acetilação de histonas, possivelmente, ativa a transcrição de genes específicos.⁽⁴⁷⁾

As características da dieta materna podem causar alterações epigenéticas que, possivelmente, ativam ou silenciam a expressão de certos genes, ajudando, assim, na determinação do fenótipo do indivíduo em formação. Se a composição nutricional da dieta materna promover o silenciamento epigenético de genes que, normalmente, protegem contra uma doença, isso pode resultar em pessoas mais susceptíveis ao desenvolvimento dessa doença na idade adulta.^(48,49)

Em estudos utilizando camundongos Yellow Agouti (A^{vy}), um dos principais modelos experimentais para avaliação do controle nutricional sob as modificações epigenéticas e desenvolvimento de doenças, foi constatado que a suplementação materna de nutrientes doadores de grupo metil (colina, betaína, ácido fólico e vitamina B12) aumentou a metilação do DNA e levou ao fenótipo magro na prole por meio do aumento da metilação do DNA do gene Agouti A^{vy} .^(50,51)

Por outro lado, a restrição protéica durante a gestação está relacionada a um impacto negativo na saúde do filho. Lillycrop *et al.* (2005)⁵², revelaram que um fenótipo poder ser induzido por meio de uma dieta hipoprotéica materna. Os pesquisadores identificaram o efeito negativo para a prole da restrição protéica materna, por promover hipometilação da região promotora do gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- α (PPAR- α) e do receptor de glicocorticóide, além do aumento da expressão de ambos no fígado dos filhotes após o desmame. Tais alterações hepáticas estão relacionadas ao aumento de acil-CoA oxidase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, levando ao fenótipo de hiperglicemia e hipertensão e aumentando o risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica.^(52,53) O mesmo grupo de pesquisadores mostrou, ainda, que uma dieta materna rica em ácido fólico é capaz de prevenir a hipometilação dos genes do PPAR-alfa e do receptor de glicocorticóide no fígado gerada pela restrição proteica.^(52,54)

Assim, como a oferta adequada de proteínas na dieta materna, a composição e quantidade de lipídios também é considerado um fator crítico associado ao desenvolvimento fetal e pode promover modificações na programação metabólica e, conseqüentemente, modular o risco para o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta dos filhos.⁽⁵⁵⁾ O consumo de ácidos graxos trans durante a gestação e lactação pode afetar a quantidade e/ou a qualidade dos lipídios transferidos para o feto e, tem sido relacionado ao desenvolvimento de um estado pró-inflamatório na prole e, conseqüente, predisposição ao desenvolvimento de obesidade e Diabetes.^(12,13,15,16)

2.2.1 O Papel da Composição de Ácidos Graxos da Dieta Materna

O consumo materno adequado de ácidos graxos, especialmente, os ácidos graxos essenciais e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, é de fundamental importância para o desenvolvimento fetal. A ingestão materna inadequada de ácidos graxos durante a gestação pode afetar o perfil de ácidos graxos que atravessam a placenta e ter efeitos sobre o desenvolvimento pós-natal.^(12,56)

Em tecidos tais como o cérebro, onde os lipídios constituem cerca de 50% de peso seco, cerca de metade do teor total de lipídios é composto de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), sendo que os ácidos graxos araquidônico e docosa-hexaenóico estão incorporados nos lipídios estruturais do cérebro em desenvolvimento, desempenhando funções essenciais, tais como; a manutenção da fluidez, permeabilidade e conformação das membranas e, portanto, são fundamentais durante o período de desenvolvimento fetal.^(12,55,56)

Por outro lado, a ingestão excessiva ou alguns tipos de ácidos graxos podem promover consequências deletérias para o feto e recém-nascido.⁽⁹⁾ Diversos estudos avaliaram a transferência placentária de ácidos graxos e identificaram sítios de ligação na membrana placentária específicos para os ácidos LC-PUFAs, porém os ácidos graxos insaturados do tipo trans (TFAs) exercem forte competição e inibição do transporte de LC-PUFAs para a placenta.^(12,56-60) Albuquerque *et al.* (2006)⁶¹ avaliaram o cérebro da prole de vinte e um dias de vida, de mães alimentadas com uma dieta rica em TFA durante a gestação e lactação, observando que as quantidades totais de PUFA, ácido araquidônico (AA) e ácido docosahexaenóico (DHA) diminuíram, significativamente, nesse tecido quando comparados ao grupo controle.

No período de lactação, o leite materno fornece ao neonato os ácidos graxos necessários para suprir suas necessidades metabólicas e, portanto, esse é outro momento crucial para a criança em desenvolvimento. Tanto a dieta materna quanto os estoques corporais maternos de ácidos graxos podem afetar a composição lipídica do leite materno.^(62,63)

Recentemente, Nishimura *et al.* (2014)⁶³ demonstraram que o teor de DHA e ácido eicosapentaenóico (EPA) na dieta materna durante o terceiro trimestre gestacional está, positivamente, associado ao conteúdo desses ácidos graxos no leite materno. Adicionalmente, os autores identificaram uma relação direta entre composição de n-3 e n-6 na dieta materna no período pós-parto e a composição do leite.⁽⁶³⁾ Da mesma forma, verificou-se que a quantidade de ácidos graxos trans presentes no leite materno é determinada pela ingestão diária.⁽⁶⁴⁾

2.2.2 Efeitos da Ingestão de Ácidos Graxos Trans na Gestação e Lactação

Os ácidos graxos insaturados do tipo trans (TFAs) são, principalmente, encontrados em produtos alimentícios industrializados, gerados a partir da hidrogenação parcial de óleos vegetais líquidos que contém ácidos graxos insaturados do tipo cis. Tal processo industrial tem como objetivo melhorar a estabilidade oxidativa, garantir manutenção das suas características químicas em produtos alimentícios com grande tempo de prateleira e a palatabilidade dessa gordura.^(1, 65)

Nas últimas décadas, diversos estudos estabeleceram os efeitos adversos do consumo de ácidos graxos trans, tais como; prejuízos no metabolismo lipídico e função endotelial, o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e resistência à insulina. A ingestão de TFA pode promover aumento do LDL-colesterol, do estresse oxidativo e da produção de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α e proteína C-reactiva), bem como uma diminuição do HDL-colesterol.^(1,2,3) Além disso, diversos autores revelaram efeitos negativos do consumo de TFAs no metabolismo da glicose. Ibraim *et al.* (2005)⁶⁶ relataram que os TFAs reduzem a sensibilidade à insulina em ratos de forma mais intensa que os ácidos graxos saturados.

A exposição à TFAs durante a vida fetal, através da sua passagem pela placenta e no período de lactação e, ainda, por meio do materno, estão, positivamente, correlacionados com a concentração plasmática de TFAs no recém-nascido.⁽⁶⁷⁾ Adicionalmente, evidências apontam que o conteúdo de ácidos graxos do leite humano está positivamente relacionado às mesmas concentrações desses ácidos graxos nos triacilglicerolplasmáticos e fosfolipídios em crianças com dois meses de idade.⁽⁶⁷⁾ Tendo em vista os prejuízos do consumo de ácidos graxos trans à saúde, o período gestacional é considerado um período crítico em que a exposição intrauterina a esse tipo de ácido graxo pode promover alterações epigenéticas significativas e comprometer a saúde do filho.

Vários estudos experimentais já relataram os efeitos prejudiciais da ingestão de TFA durante a gestação e lactação para a prole. Nesse sentido, Ibrahim *et al.*

(2009)⁶⁸, investigaram os efeitos da dieta materna rica em PUFA n-6, n-3 PUFAs ou TFA no metabolismo da glicose, na sensibilidade à insulina e no perfil de ácidos graxos na prole masculina. Os resultados indicaram que uma dieta materna rica em PUFA n-6 ou n-3 não alteraram a sensibilidade a insulina de filhotes machos de 105 dias de vida. Entretanto, a ingestão materna de TFA em baixos níveis, reduziu a expressão gênica de mRNA para adiponectina e GLUT-4 em tecido adiposo. Esta programação predispõe os mesmos ao desenvolvimento de resistência à insulina quando adultos.⁽⁶⁹⁾

Segundo Albuquerque *et al.* (2006)⁶¹, em estudo realizado em ratos, verificou que a ingestão de gordura vegetal hidrogenada, rica em TFA, durante a gestação e lactação promoveu redução da quantidade de IRS-1 hipotalâmica e da resposta anorexígena à insulina. Pisani *et al.* (2008)¹³ detectaram que a dieta materna rica em TFA durante a gestação e lactação promoveu na prole com vinte e um dias de vida elevação no conteúdo de gordura da carcaça, na concentração sérica de triglicérides e de colesterol, na expressão gênica de PAI-1 e TNF- α no tecido adiposo e, também, redução na concentração sérica de leptina, adiponectina e do mRNA de adiponectina no tecido adiposo. Adicionalmente, o mesmo grupo de pesquisadores no mesmo modelo experimental detectou um aumento da expressão gênica de PAI-1 no tecido adiposo da prole com noventa dias de vida. Tal fato, não foi observado na prole de mães que ingeriram dieta controle e após o desmame foram tratados com dieta trans até os noventa dias de vida.⁽¹⁵⁾

Duque-Guimarães *et al.* (2009)⁶⁹ observaram aumento dos níveis plasmáticos de triacilglicerol, razão colesterol total/HDL, insulina, razão insulina/glicose e mRNA para resistina e TNF- α acompanhada de redução do mRNA para adiponectina no tecido adiposo retroperitoneal na prole com 120 dias de vida de mães que ingeriram uma dieta rica em TFA (6%) durante a gestação e lactação. Em acordo com esse estudo, Hachul *et al.* (2013)³¹, observaram que o consumo materno de TFA (7%) promoveu na prole de vinte e um dias um aumento no conteúdo de TNF- α no RET e redução dos níveis séricos de adiponectina. Problemas cardiometabólicos e metabólicos como a diabetes do Tipo 2 podem estar associados à obesidade e parecem estar relacionados com a alteração da produção de adipocinas, tais como: leptina, resistina, adiponectina, TNF- α , PAI-1 e haptoglobina.^(70,71,72)

Os níveis de TNF- α estão aumentados na obesidade.⁽⁷³⁾ Trata-se de uma citocina produzida, principalmente, por monócitos, linfócitos, tecido adiposo e músculo, exercendo funções por meio de receptores TNFR1 e TNFR2.⁽⁷⁴⁾ Sabe-se que esta citocina está, diretamente, associada à regulação da sensibilidade à insulina, por meio de diversos mecanismos, incluindo a alteração na capacidade de fosforilação do receptor de insulina, redução da expressão gênica de transportadores de glicose GLUT-4, elevação dos níveis de ácidos graxos livres no plasma.^(74,75) A fosforilação de IRS-1 em resíduos serina/treonina atenua a via de sinalização de IRS-1 por inibir a fosforilação de resíduos de tirosina.⁽⁷⁶⁾

Molécula reguladora da homeostase vascular, o fator pró-tromboembolítico inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), inibe a ativação do plasminogênio e por consequência suprime a formação de plasmina, que está, diretamente, envolvida com a fibrinólise. Vários estudos concluíram que o aumento sérico de PAI-1 se correlaciona, diretamente, com a incidência de doenças cardiometabólicas e tromboembolíticas^(77,78,79) e, portanto, sugerindo que a alta incidência de problemas cardiovasculares, presente nos quadros de obesidade, pode estar relacionada em parte à elevação da produção de PAI-1 pelos adipócitos.

A adiponectina, sintetizada em grande quantidade pelo tecido adiposo, atua aumentando a sensibilidade à insulina no tecido muscular e no fígado, reduzindo a produção de glicose hepática e a concentração de triacilglicerol no músculo⁽⁸⁰⁾, age estimulando a utilização de glicose e oxidação de ácidos graxos⁽⁸¹⁾, e possui efeito anti-aterogênico.^(82,83) A concentração plasmática de adiponectina está, negativamente, correlacionada com concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-colesterol e triacilglicerol e, positivamente, relacionada com os níveis de HDL-colesterol.⁽⁸⁴⁾

Embora os adipócitos sejam responsáveis por boa parte da síntese de adiponectina, seus níveis séricos não aumentam com a obesidade. Pelo contrário, muitos autores encontraram níveis plasmáticos reduzidos de adiponectina, acompanhado de aumento de leptina, TNF- α e IL-6, em indivíduos obesos⁽⁸⁵⁾ (Figura 1), resistentes à insulina, diabéticos, hipertensos e portadores de doenças coronarianas.^(86,87) Portanto, constata-se que a redução de adiponectina pode ser

um dos fatores chave para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiometabólicas associadas à obesidade.

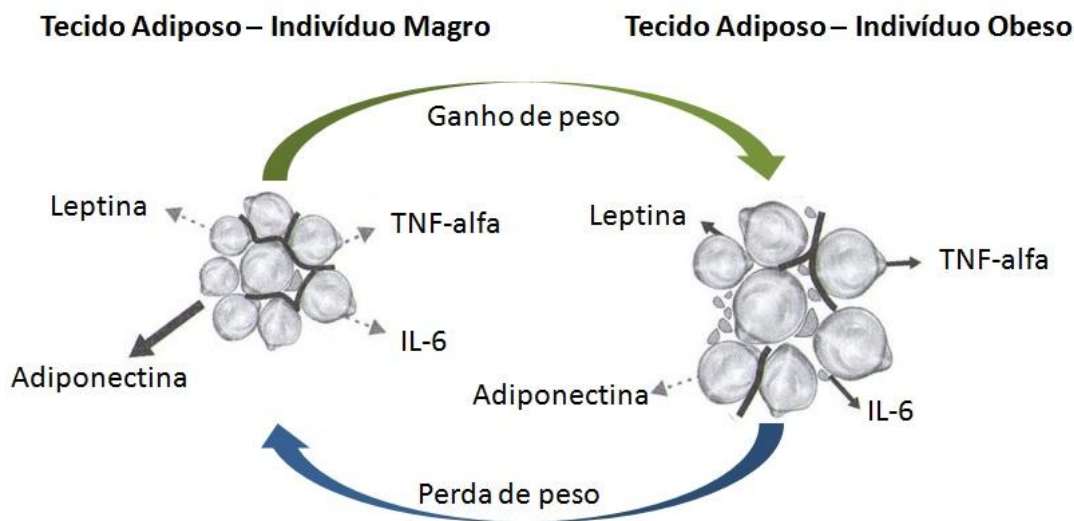


Figura 1. Esquema representativo da síntese de moléculas pró e antiinflamatórias em tecido adiposo normal e tecido adiposo em obesidade. Fonte: adaptado de Forsythe et al., 2008.⁽⁸⁵⁾

Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina também foram observados em múltiplos estudos. A administração de adiponectina promoveu supressão de moléculas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, além de melhorar a disfunção endotelial e a produção de óxido nítrico.⁽⁸⁷⁾ Segundo Yamaguchi *et al.* (2005)⁽⁸⁸⁾, a adiponectina em macrófagos (RAW264) inibiu a via de sinalização dos TLRs e a via do NF- κ B, bloqueando a resposta inflamatória.

Previamente, observamos que a dieta materna rica em TFA promoveu redução da adiponectina plasmática⁽³¹⁾ aumento na concentração sérica de insulina, a expressão da proteína TRAF6 no tecido adiposo retroperitoneal e mRNA TLR4 no músculo sóleo. Esses resultados foram acompanhados por uma diminuição da expressão proteica do receptor 1 de adiponectina (AdipoR1) em RET dos filhotes com vinte e um dias de idade.⁽¹⁴⁾ Ainda seguindo o mesmo modelo experimental encontramos um aumento na endotoxemia e nas concentrações hipotalâmicas de IL-6, TNF- α e IL1- β , bem como, redução nos níveis de RNAm de ADIPOR1 no

hipotálamo dos filhotes com noventa dias de vida provenientes de ratas que receberam dieta rica em TFA durante a gestação e lactação.⁽¹⁶⁾

Toll like receptors (TLRs) são receptores transmembranares localizados, em sua maioria, na superfície celular e reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e agentes da resposta imune inata, ativando várias vias de sinalização inflamatória. Já foram identificados mais de 10 membros da família de TLR em mamíferos, sendo onze em humanos e treze em ratos.^(88,89) Os TLRs participam da regulação do metabolismo energético por meio da ação no tecido adiposo. Estudos recentes têm investigado o papel dos TLRs em distúrbios metabólicos, como a obesidade, resistência à insulina e aterosclerose.^(90,91)

A ativação de TLR por ligantes específicos desencadeia a ativação de várias proteínas dependentes ou não do fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). A ativação de proteínas adaptadoras citoplasmáticas, tais como MyD88, provoca a fosforilação e ativação de proteínas da família IRAK e TRAF. IRAK-1 e TRAF-6 quando ativados levam à ativação da IB-quinase (IKK) de complexos MAPKs, promovendo, posteriormente, o desacoplamento do fator nuclear- κ B (NF- κ B) da sua proteína inibidora (I κ -B), sua migração para o núcleo, iniciando, assim, a amplificação gênica de proteínas relacionadas à inflamação, tais como IL-6, TNF- α , MCP-1, e IL-1 (Figura 2). Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o NF κ B por meio de duas moléculas adaptadoras, TRIF e TRAM. Por outro lado, a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) induz a infiltração de macrófagos no tecido adiposo que, por sua vez, desencadeiam uma cascata inflamatória causando liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e IL-6, através da ativação do NF- κ B (Figura 2).^(92,93)

OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

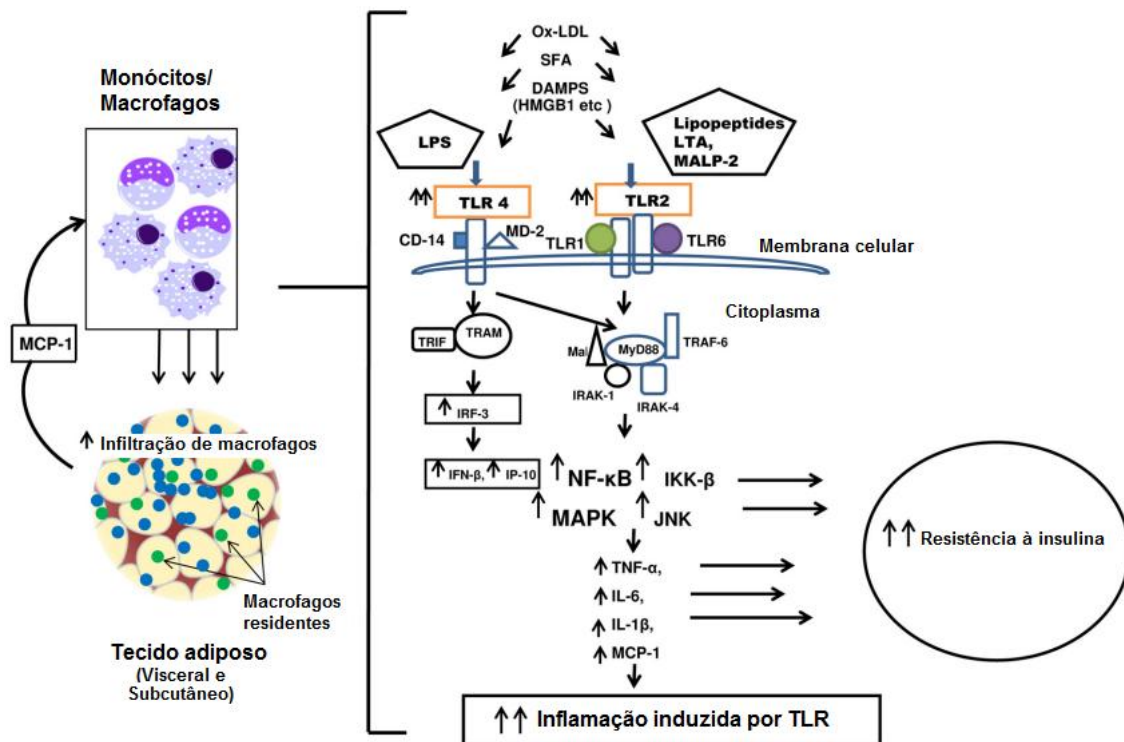


Figura 2. Esquema representativo das cascatas de sinalização dos receptores TLR2 e TLR4, mediadas pelas vias dependentes e não dependentes de MyD88, relacionadas à inflamação e resistência à insulina presentes na obesidade e síndrome metabólica. Ox-LDL (LDL oxidada), SFA (ácidos graxos saturados), LPS (Lipopolissacarídeos), LTA (ácido lipoteicóico), MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide - TLR2/6 agonist), TLR2 (Toll like receptor 2), TLR4 (Toll like receptor 4), TLR1 (Toll like receptor 1), TLR6 (Toll like receptor 6), TRIF (Adaptador Contendo O Domínio TIR Induzindo Interferon-Beta), TRAM (Molécula Adaptadora Relacionada ao Trif), IFN-β (Interferon beta), IP-10 (interferon- inducible protein 10), MYD88 (Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88), TRAF-6 (Fator 6 Associado ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral), IRAK-1 (Quinase Associada ao Receptor da IL-1), IRAK-4 (Quinase Associada ao Receptor da IL-4), NFκB (Fator Nuclear Kappa B), IKK-β (IκB kinase), MAPK (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos), JNK (Jun N-terminal kinase), TNF-α (Fator de Necrose Tumoral Alfa), IL-6 (Interleucina 6), IL-1β (Interleucina 1 beta), MCP-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos 1). Fonte: Adaptado de Jialal et al., 2014.⁽⁹³⁾

Radin *et al.* (2008)⁹⁰ observaram que a inibição de TLR4 no músculo esquelético reduz a capacidade de uma infusão lipídica induzir resistência à insulina. A via do NF-κB é mediada pela ativação de TLR4 levando a efeitos deletérios na

ação da insulina no músculo esquelético. O ganho de peso, peso do tecido hepático e a esteatose induzida por dieta hiperlipídica foram menores em camundongos deficientes em TLR4.

Em recente revisão da literatura, Menitti et al. (2015) concluiu que o consumo de TFA durante a gestação e lactação parece promover efeitos deletérios sobre a saúde do filho, prejudicando o desenvolvimento e aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias por ativação TLR4, fatores envolvidos no desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e doença cardiovascular (Figura 3).

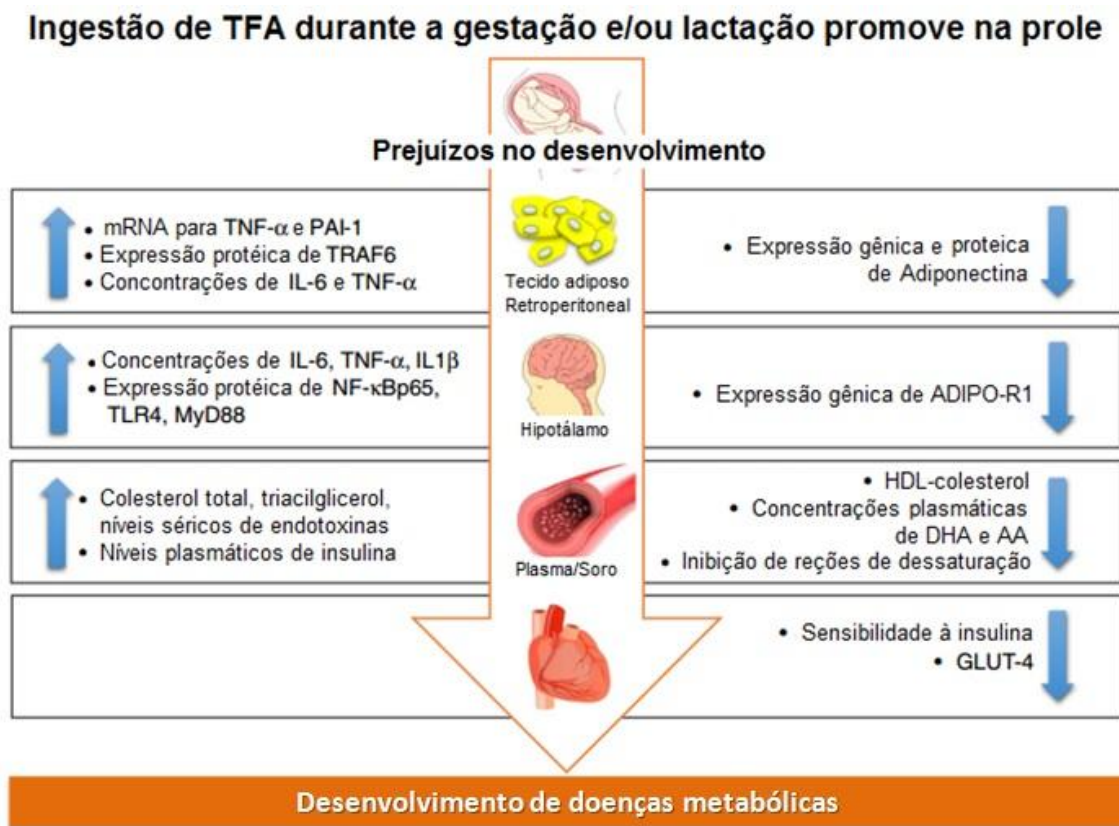


Figura 3. Representação esquemática dos efeitos da ingestão maternal de TFA durante a gestação e/ou lactação no desenvolvimento de doenças metabólicas no filho. Fonte: Menitti et al., 2015.

Entende-se com os dados da literatura que a ingestão materna de TFA durante períodos críticos para o desenvolvimento do feto contribui para a resistência

à insulina na prole e favorece o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiometabólicas.

2.3 O Papel do Intestino no Desenvolvimento de Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica é uma condição caracterizada por um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular e diabetes tipo 2, tais como: obesidade abdominal, elevação da pressão arterial, da glicemia de jejum e triacilgliceróis, acompanhado de redução do nível de colesterol HDL. Tais fatores estão relacionados com o aumento de peso e acúmulo de gordura visceral. A presença de síndrome metabólica está associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e mortalidade.^(94, 95)

Na última década as pesquisas relacionando a microbiota intestinal e o desenvolvimento de doenças metabólicas se intensificou. O intestino dos mamíferos possui uma comunidade microbiana, conhecida como microbiota intestinal, composta por trilhões de microrganismos, sendo dois os filos dominantes de bactérias presentes: Bacteroides e Firmicutes. Sua composição pode variar de acordo com alguns fatores como: nutrientes da dieta, doenças e uso de antibióticos.⁽⁹⁶⁾

Diversos pesquisadores observaram uma correlação positiva entre o desenvolvimento de doenças metabólicas, as alterações na microbiota intestinal e a produção de citocinas pró-inflamatórias.^(68,97) Segundo Ley (2006)⁹⁶, ratos geneticamente obesos ob/ob (leptina deficiente), após tratamento com dieta rica em polissacarídeos, apresentaram mais Firmicutes e 50% menos Bacteroidetes no intestino distal quando comparados com o tipo selvagem. A redução de proporção de Bacteroides foi a primeira modificação relacionada a obesidade documentada por Ley *et al.* (2005)⁹⁶, seguida de outros pesquisadores que relataram dados semelhantes. Turnbaugh *et al.* (2008)⁹⁸, por exemplo, observaram que o desenvolvimento do estado pró-inflamatório encontrado na obesidade estava associado com o enriquecimento de Firmicutes e diminuição da Bacteroidetes em ratos tratados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica. Santacruz *et al.* (2010),

também observaram aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes em mulheres grávidas com excesso de peso.

Por outro lado, o mesmo não foi observado por outros pesquisadores em pesquisas subsequentes. Duncan *et al.* (2008)⁹⁹ não detectaram diferenças para o filo Bacteroides entre indivíduos obesos e não obesos. Zhang *et al.* (2009)¹⁰⁰ observaram aumento na proporção de Bacteroides em indivíduos obesos quando comparados aos magros. A partir desses dados, constatou-se que a proporção de Bacteroides não sofre as mesmas alterações em todos os obesos e podem variar de acordo com a fase da vida.⁽¹⁰⁰⁾

Tendo em vista o importante papel da microbiota materna na colonização do intestino no filho, pesquisadores investigaram as mudanças nessa fase da vida da mulher. Collado *et al.* (2008)¹⁰¹ identificaram mais Bacteroides spp. *Staphylococcus aureus* em mulheres grávidas com excesso de peso do que naquelas que apresentavam peso normal. O total de Bacteroides também teve correlação positiva no peso e IMC (Índice de massa corpórea). O número de Bifidobacterias foi maior em mulheres eutróficas e naquelas que ganharam menos peso durante a gestação. Santacruz *et al.* (2010) realizou uma comparação entre a microbiota intestinal antes e após a gestação, com trinta e quatro mulheres eutróficas e dezesseis mulheres com excesso de peso. Os resultados observados indicaram que havia uma menor proporção de *Bifidobacterium* spp e *Bacteroides* spp. em mulheres com excesso de peso quando comparadas com mulheres de peso normal, ao passo que houve uma tendência oposta para *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae*.

Evidências recentes na literatura indicam que o gênero *Lactobacillus* spp., pertencente ao filo Firmicutes, apresenta efeitos benéficos relacionados ao controle do ganho de peso corporal. *Lactobacillus* spp. tem sido associado à alguns efeitos benéficos, tais como: menor ganho de peso na gestação em mulheres obesas e seus níveis correlacionados à menor peso ao nascer de seus filhos⁽²²⁾; redução do tamanho dos adipócitos e células de gordura corporal em ratos alimentados com dieta rica em gordura⁽²⁵⁾; redução de massa gorda e IMC em pacientes diabéticos obesos, além de melhora da sensibilidade à insulina.⁽²⁶⁾ Arora *et al.* (2014)¹⁰², em estudo realizado em ratos verificaram que *Lactobacillus plantarum* promoveu redução do estado inflamatório e endotoxemia, enquanto Peña e Versalovic

(2003)¹⁰³ reportaram efeito antiinflamatório, com redução da produção de TNF- α , relacionado ao tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* em macrófagos.

Drissi et al. (2014)¹⁰⁴ examinaram 13 genomas completos, previamente já associado com o ganho de peso ou proteção para o ganho de peso, pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. De acordo com os autores, as espécies relacionadas com efeitos benéficos no controle de peso corporal são *L.plantarum* e *L.gasseri*, por meio de mecanismos que envolvem a participação na degradação de frutose e a síntese de dextrina, L-ramnose e acetato. Esses produtos já foram relacionados na literatura a efeitos protetores contra o desenvolvimento de obesidade em animais.⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾ Os dados da literatura ainda são controversos a respeito do gênero *Lactobacillus* spp. e, portanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos no sentido de desvendar as modificações ocorridas na microbiota intestinal durante a gestação e sua relação com o ganho de peso gestacional.

A endotoxemia também é um fator que promove a ativação da via de sinalização de TLRs e, conseqüentemente, promove a inflamação. Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), são gerados a partir da quebra de bactérias gram-negativas residentes da microbiota intestinal e translocados para os capilares intestinais, transportados do intestino aos tecidos por meio dos quilomicrons em resposta à dieta rica em gordura.^(21,23)

Dietas hiperlipídicas têm sido relacionadas à alterações na permeabilidade intestinal, por meio de mecanismos associados à redução da expressão de proteínas ligantes (*tight junction*) como a zonulina-1 e ocludina. A síntese elevada de TNF- α é um dos fatores relacionados à alterações nessas proteínas, promovendo aumento dos níveis plasmáticos de LPS. Além da dieta hiperlipídica, outros fatores, tais como o consumo de álcool, estresse e radiação, estão envolvidos no aumento da permeabilidade intestinal.^(99,107)

LPS agem sobre receptores da família TLR, em particular o TLR4, ativando a via do NF- κ B, favorecendo a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6.^(109,110) Creely et al. (2007)¹¹⁰ identificaram um aumento nas concentrações circulantes de endotoxina em mulheres portadoras de diabetes *mellitus* do tipo 2, acompanhado de aumento na expressão protéica de TLR2 e a secreção de IL-6 e TNF- α por adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo.

Outro ponto importante relacionado ao papel do intestino no desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas, é a relação entre esse órgão e o controle da ingestão alimentar. O intestino é considerado o maior órgão endócrino do organismo. O papel dos peptídeos intestinais e gastrointestinais no controle da fome e ingestão alimentar tem sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas. A regulação da ingestão alimentar ocorre por meio da comunicação entre o sistema nervo entérico e o cérebro.^(27,28,29) Os principais peptídeos gastrintestinais implicados na regulação da ingestão alimentar são: peptídeo-YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP), peptídeo glucagon-simile 1 (GLP-1), oxintomodulina (OXM), colecistocinina (CCK) e grelina.^(27,28,29)

Peptídeo que contém 28 aminoácidos e conhecida por seu efeito orexígeno, a grelina é produzida principalmente no estômago, mas sintetizada, também, em pequenas concentrações no intestino delgado, fígado, pâncreas, rim, pulmão, hipófise, hipotálamo, placenta e testículos.^(111,112,113) Inicialmente a grelina foi conhecida por estimular a liberação de hormônio do crescimento (GH), mas, posteriormente, seus efeitos na regulação da ingestão alimentar também foi descoberta.^(111,114)

Em condições fisiológicas, a grelina oscila em um padrão rítmico de secreção e tem seu pico de liberação imediatamente anterior uma refeição. Portanto, a grelina está envolvida no estímulo para o início da ingestão alimentar, possivelmente por meio de ativação do sistema nervoso simpático.⁽¹¹⁵⁻¹⁷⁾ Outras evidências indicam, também, que a grelina aumenta a frequência da alimentação, sem afetar o tamanho de alimentação, aumenta a motilidade gástrica, e diminui a secreção de insulina, além de induzir a lipogênese em tecido adiposo branco por meio da inibição do sistema melanocortina hipotalâmico.^(114,118-120)

Outros fatores importantes relacionados ao controle da ingestão alimentar são: neuropeptídeos POMC, CART e NPY. NPY (neuropeptídeo Y) é um neuropeptídeo orexígeno, enquanto POMC (peptídeos anorexígeno pró-opiomelanocortina) e CART (transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina) apresentam efeitos anorexígenos. Hormônios anorexígenos promovem a ativação de neurônios no núcleo arqueado do hipotálamo que expressam a POMC e levam à

síntese do hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH), que, por sua vez, se liga a receptores de melanocortina promovendo a redução da ingestão alimentar. Por outro lado, hormônios que potencializam os efeitos orexígenos aumentam a expressão de NPY, que antagonizam os efeitos da POMC e do CART. Dados da literatura relacionam o aumento da atividade de neurônios orexígenos é estimulada pela elevação dos níveis gástricos do hormônio grelina, porém após a alimentação este hormônio retorna aos níveis basais. O aumento dos hormônios leptina, insulina e peptídeo YY (PYY) elevam a produção do α -MSH, antagonizando a atividade dos neurônios NPY e, conseqüentemente, reduzindo a ingestão alimentar.⁽¹²¹⁻¹²³⁾

Peptídeos glucagon-símile, como GLP-1 e GLP-2, são secretados e liberados pelas células L do intestino. GLP-1 exerce efeitos por meio de ligação ao receptor de GLP-1, proteína ligada a adenilato ciclase (GLP-1R), expresso em células do pâncreas, rins, pulmões, cérebro, trato gastrointestinal e coração.⁽¹²⁴⁾ Diversos estudos têm relacionado ao GLP-1 efeitos anorexígenos, por meio do aumento de sinais de saciedade e redução o esvaziamento gástrico.⁽¹²⁵⁾ Níveis reduzidos de GLP-1 podem estar associados à obesidade. Naslund et al., (2004)¹²⁶ verificaram que a administração subcutânea de GLP-1 em indivíduos obesos antes das refeições promoveu redução da ingestão alimentar e perda de peso.

2.4 A ingestão de Prebióticos na Gestação e Lactação

Os polissacarídeos constituem a principal fonte energética de bactérias comensais que colonizam o intestino grosso. A degradação desses polissacarídeos levam à geração de produtos intermediários tais como o lactato, succinato e ácidos graxos de cadeia curta (butirato, acetato, propionato), que desempenham funções importantes. Portanto, entre as estratégias utilizadas para modular a composição microbiana intestinal, está a ingestão de fibras prebióticas.⁽¹²⁷⁾

Prebióticos são polissacarídeos fermentados pelas bactérias do cólon e que podem alterar o ambiente intestinal no que concerne a população bacteriana e a permeabilidade intestinal.⁽³⁶⁾ Devido à sua β -configuração, oligofrutose e outros

frutanos do tipo inulina são hidrolisados e fermentados pela microbiota colônica e, desse modo, são considerados fibras alimentares prebióticas.⁽¹²⁸⁾

Presente naturalmente em diversas frutas e vegetais, a oligofrutose é um oligossacarídeo que apresenta ligações tipo $\beta(2-1)$ entre as moléculas de frutose e, com isso, são resistentes à digestão pelas enzimas gastrointestinais. A oligofrutose sofre fermentação no ceco e cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que, por sua vez, promovem modificações na composição bacteriana intestinal e pH colônico.^(55,127-131)

Canli *et al.* (2007)³⁰ observou que a suplementação com oligofrutose, promoveu alterações na composição da microbiota intestinal e melhoria dos parâmetros metabólicos de inflamação e endotoxemia em animais tratados com a dieta hiperlipídica.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produtos finais da fermentação bacteriana, podem promover as alterações na permeabilidade intestinal, reduzindo, assim, a translocação de LPS na circulação sanguínea.^(36,130) Nesse sentido, evidências recentes indicam que oligofrutose é capaz de induzir a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), reduzindo a endotoxemia e promovendo atividade anti-inflamatória.^(132,133)

Nakamura *et al.* (2011)¹³⁴ identificaram que a administração oral, em camundongos, de 2,5g/kg de emulsão lipídica contendo frutooligosacarídeos (FOS), outro frutano do tipo inulina, suprimiu, significativamente, a elevação de triacilglicerol no plasma quando comparado a animais que receberam apenas emulsão lipídica. Nesse mesmo estudo, quando os animais eram submetidos a uma dieta rica em gordura com ou sem 2,5% de suplementação de FOS por doze semanas, peso corporal, porcentagem de gordura corporal, tecido adiposo visceral e o conteúdo de triglicerídeos no fígado foram menores em animais que consumiram FOS.⁽¹³⁵⁾

Canli *et al.* (2007) verificaram que a dieta hiperlipídica promoveu resistência à insulina em camundongos, acompanhada de aumento de endotoxina circulante e da expressão gênica de IL-6, TNF- α , IL-1 β e PAI-1 em tecido adiposo.⁽³⁰⁾ Esse mesmo grupo verificou que a suplementação com oligofrutose aumentou o conteúdo de Bifidobactérias e reduziu a endotoxemia induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica,

sugerindo que o aumento de Bifidobactérias promovido pelos prebióticos exerce um efeito protetor contra a endotoxemia induzida pela dieta rica em gordura.^(30,33)

A ingestão de probióticos e fibras alimentares durante a gestação pode ser considerada benéfica para a mãe e para a criança, uma vez que, a colonização bacteriana do recém-nascido ocorre sob fortes influências da microbiota intestinal materna.⁽¹³⁵⁾ A amamentação é também um período importante para essa colonização como, por exemplo, a transferência de bactérias para o recém-nascido por meio do leite materno.⁽¹³⁶⁾

Recentemente, Paul *et al.* (2016), realizou estudo com ratas Sprague-Dawley induzidas à obesidade por dieta rica em sacarose e gordura e avaliou o efeito da suplementação materna de oligofrutose (10%). A ingestão de prebióticos melhorou o metabolismo materno e aumentou hormônios intestinais relacionados à redução da ingestão alimentar, PYY e GLP-1 e GLP-2 nas mães e na prole com vinte e um dias de vida. Em síntese, os autores concluíram que a suplementação de oligofrutose (10%) durante a gestação e lactação melhora o metabolismo materno em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica atenuando a programação metabólica associada à obesidade materna.

Por outro lado, nosso grupo de pesquisadores, previamente, demonstrou que o consumo materno de uma dieta suplementada com oligofrutose (10%), durante a gestação e lactação, exerceu um efeito pró-inflamatório decorrente de um aumento na endotoxemia em ratas Wistar.^(31,32) Ainda são poucos os estudos desenvolvidos com a suplementação de fibras prebióticas durante a gestação e lactação, portanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos no sentido de identificar esses efeitos.

3 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito de uma dieta suplementada com OF (10%) ou de uma dieta contendo gordura vegetal hidrogenada (7%), rica em TFA, durante a gestação e lactação, sobre parâmetros metabólicos e inflamatórios de ratas lactantes e da prole, com noventa dias de vida, no que concerne a endotoxemia, metabolismo e parâmetros inflamatórios. Adicionalmente, avaliamos se a dieta suplementada com OF (10%) modifica esses parâmetros na prole, com noventa dias de vida, de mães que receberam dieta contendo TFA durante gestação e lactação.

3.1 Objetivos Específicos

Nas mães que receberam gordura vegetal hidrogenada (7%) ou oligofrutose (10%) durante a gestação e lactação, avaliamos:

- Consumo alimentar e evolução da massa corporal;
- Conteúdo de gordura e proteína na carcaça;
- Peso relativo do fígado, tecidos adiposos retroperitoneal e parametrial, músculos sóleo e EDL.
- Conteúdo de IL-6, IL-10, TNF- α e razão IL-10/TNF- α no fígado, tecido adiposo retroperitoneal, músculos sóleo e EDL.
- A concentração sérica de lipopolissacarídeos, triacilglicerol, colesterol total, HDL-colesterol, glicose, ácidos graxos livres, adiponectina, insulina, grelina, NPY.
- Níveis de DNA genômico para *Lactobacillus* spp. no cólon.

Nos filhotes machos com noventa dias de vida (tratados com dieta controle contendo ou OF), provenientes de ratas que ingeriram gordura vegetal hidrogenada (7%) ou dieta suplementada com OF (10%), durante a gestação e lactação, avaliamos:

- Consumo alimentar, evolução da massa corporal, evolução do comprimento naso-anal, a eficiência metabólica e Índice de Lee;
- Conteúdo de gordura e proteína na carcaça;
- Peso relativo do fígado, tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, músculos sóleo e EDL;
- Conteúdo de IL-6, IL-10, TNF- α e razão IL-10/TNF- α no fígado, tecido adiposo retroperitoneal, músculos sóleo e EDL;
- A concentração sérica de lipopolissacarídeos, triacilglicerol, colesterol total, HDL-colesterol, glicose, ácidos graxos livres, TNF- α , leptina, insulina, grelina, NPY;
- Níveis de DNA genômico para *Lactobacillus* spp. no cólon;
- A expressão protéica dos seguintes receptores: IL-6R α , IL-10R α , AdipoR1, p-IKB α , p-NFkB-p50 e p-NFkB-p65 no tecido muscular sóleo;
- A expressão protéica dos seguintes receptores: IL-10R α , AdipoR2, p-IKB α , p-NFkB-p50 e p-NFkB-p65 no fígado.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), número CEP 1907/11 (anexo 1), ratos machos e fêmeas virgens da linhagem Wistar, com dois meses de idade, procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da UNIFESP (CEDEME), foram mantidos sob condições de ciclo de luz, doze horas claro e doze escuro, e, também, em temperaturas controladas de $24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Aos três meses de idade as ratas foram acasaladas. No dia seguinte, verificamos a presença de espermatozóides na luz vaginal. Para tanto, uma pequena quantidade de salina (0,9%) foi introduzida na vagina e, a seguir, aspirada, utilizando-se um conta-gotas. Constatada a provável concepção, isto é, o primeiro dia da gestação, as fêmeas foram mantidas em gaiolas plásticas individuais.

No dia do nascimento, considerado dia zero da lactação, a ninhada foi ajustada para oito filhotes machos para cada mãe. No vigésimo primeiro dia da lactação os animais foram desmamados e as mães eutanaziadas. Parte dos filhotes foi eutanaziada, imediatamente, e os demais foram mantidos em gaiolas individuais até noventa dias de vida.

Grupos Experimentais:

No primeiro dia de gestação, as ratas foram divididas em três grupos, de acordo com a dieta que receberiam durante toda gestação e lactação (Figura 4):

Grupo Controle (C) – dieta contendo óleo de soja como fonte de gordura;

Grupo Controle OF (OF) – dieta contendo óleo de soja como fonte de gordura com suplementação de oligofrutose (10%); e

Grupo Trans (T) – dieta contendo gordura vegetal hidrogenada como fonte de gordura.

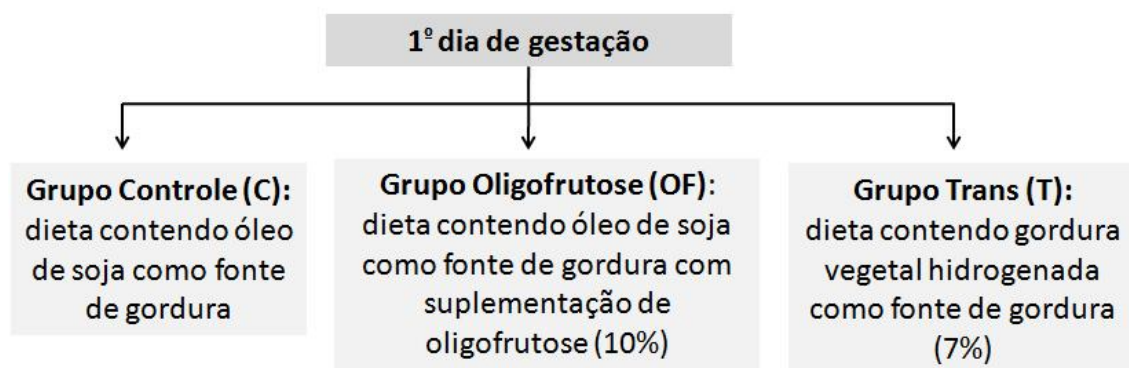


Figura 4. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais de ratas gestantes.

Parte da prole recebeu dieta controle com ou sem suplementação com OF até noventa dias de vida, constituindo os grupos (Figura 5):

Controle-Controle (C-C) – continuou recebendo dieta Controle;

Controle OF-Controle (OF-C) – passou a receber dieta Controle;

Trans-Controle (T-C) – passou a receber dieta Controle; e

Trans- OF (T-OF) – passou a receber dieta contendo óleo de soja como fonte de gordura com suplementação de oligofrutose (10%).

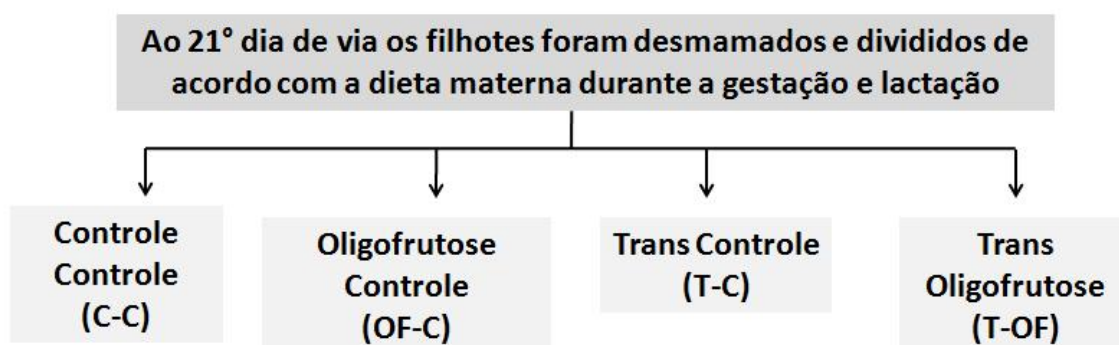


Figura 5. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais de filhotes, após desmame.

4.2 Composição das Dietas

As dietas foram preparadas no laboratório e sua composição seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93).^(137,138) As ratas gestantes e lactantes bem como seus filhotes, até dois meses de vida, receberam dieta de crescimento (G), contendo 20% de proteína (AIN-93G). Durante o terceiro mês de vida os filhotes receberam dieta de manutenção (M), contendo 14% de proteína e a quantidade de fosfato na mistura de minerais foi ajustada a fim de manter a relação Ca: P, uma vez que a caseína contém fosfato (AIN-93M), conforme tabela 1.

Tabela 1- Composição das dietas (g/100g) – AIN-93G e M

Ingredientes	Controle	Trans	Oligofrutose
Caseína*	20 (14)	20 (14)	20 (14)
L-cistina†	0,3 (0,18)	0,3 (0,18)	0,3 (0,18)
Amido‡	62 (71,1)	62 (71,1)	52 (61,1)
Óleo de soja‡	8 (5)	1	8 (5)
Gordura Vegetal Hidrogenada\$	-	7 (4)	-
BHT(butilhidroxitolueno)†	0.0014(0.0008)	0.0014(0.0008)	0.0014(0.0008)
Mistura de minerais£	3,5	3,5	3,5
Mistura de vitaminas#	1,0	1,0	1,0
Oligofrutose¶	-	-	10,0
Celulose‡	5,0	5,0	5,0
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25

AIN93 G - Dieta de crescimento; AIN93 M - Dieta de manutenção.

*Caseína foi obtida a partir da Labsynth, São Paulo, Brasil.

†L-cistina, amido, BHT, celulose e bitartarato de colina foram obtidos na Viafarma, São Paulo, Brasil.

‡Óleo foi fornecido pela soja (Lisa/Ind. Brasil).

\$Gordura Vegetal Hidrogenada foi fornecida pela Unilever, São Paulo, Brasil.

£Mix de Minerais (mg/kg de dieta): cálcio, 5000; fósforo, 1561; potássio, 3600; sódio, 1019; cloreto, 1571; enxofre, 300; magnésio, 507; ferro, 35.0; cobre, 6.0; manganês, 10.0; zinco, 30.0; cromo, 1.0; iodo 0.2; selênio, 0.15; fluoreto, 1.00; boro, 0.5; molibdênio, 0.15; silício, 5.0; níquel, 0.5; lítio, 0.1; vanádio, 0.1 (Mix de minerais AIN-93G, Rhoster, Brasil).

#Mix de Vitaminas (mg/kg de dieta): tiamina HCL, 6.0, riboflavina, 6.0; piridoxina HCL 7.0; niacina, 30.0; pantotenato de cálcio, 16.0; ácido fólico, 2.0; biotina, 0.2; vitamina B12, 25.0; vitamina A palmitato 4000 IU; vitamina E acetato, 75; vitamina D3, 1000 IU; vitamina K1, 0.75 (Mix de vitaminas AIN-93G, Rhoster, Brasil).

¶Oligofrutose (P95) foi fabricada pela Orafiti (Pemuco, Chile) e foi obtida a partir da Viafarma, São Paulo, Brasil.

As dietas suplementadas com prebiótico (OF) foram acrescidas com 100g/kg de dieta de oligofrutose (Orafiti P95, Pemuco, Chile). Segundo o fabricante, a oligofrutose usada nesse estudo é uma mistura de oligossacarídeos extraídos da

raiz da chicória. Esses oligossacarídeos são constituídos por unidades de frutose conectadas por ligações β (2 $\rightarrow$ 1) e algumas dessas moléculas possuem uma glicose na unidade terminal. O Anexo 2 apresenta o certificado de análises da oligofrutose distribuída pela empresa Viafarma (São Paulo, Brasil). As dietas foram analisadas previsamente por Pisani *et al.* (2008) a fim de determinar o perfil de ácidos graxos.

4.3 Procedimento experimental

Após a constatação da provável concepção as ratas foram pesadas semanalmente, até o vigésimo primeiro dia de lactação. O peso e comprimento nasoanal dos filhotes foi aferido um dia após o nascimento e semanalmente até completarem noventa dias de vida. O índice de Lee foi calculado dividindo a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal (cm) e multiplicando o resultado por 1000.⁽¹³⁹⁾

Todos os animais foram eutanaziados por decapitação. O sangue foi coletado e centrifugado a 2500 rpm durante trinta minutos para obtenção do soro que foi armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas, da endotoxemia, citocinas, ácidos graxos livres (AGL) e níveis hormonais.

O tecido adiposo branco retroperitoneal (RET), o fígado e os músculos sóleo e EDL foram retirados e colocados, imediatamente, em nitrogênio líquido, colocados em tampão específico para realização de western blotting ou ELISA e armazenados a -80°C .

O intestino e fezes foram retirados e separados nas porções: ceco e cólon e colocado em nitrogênio para a determinação do DNA das bactérias presentes nessas porções por PCR em tempo real.

As carcaças dos animais foram evisceradas, pesadas e mantidas a -20°C até a análise do conteúdo de gordura e proteína. O conteúdo total de lipídios foi extraído conforme descrito por Stansbie *et al.* (1976)¹⁴⁰ e quantificado por meio de método gravimétrico¹⁴¹.

4.4 Conteúdo de Gordura e Proteína da Carcaça

As carcaças foram autoclavadas a 120°C por noventa minutos e homogeneizadas com o dobro do peso de água. Triplicatas da mistura, aproximadamente 2 gramas, pesadas em balança analítica e digeridas em tubos de vidro, hermeticamente fechados com 3 mL de 30% KOH por quinze minutos a 70°C, e em seguida acrescidos 3,0 mL de etanol absoluto por mais duas horas. Após resfriamento, 2 mL de 12N H₂SO₄ foram adicionados e os tubos homogeneizados. A seguir, a mistura foi lavada três vezes por dez minutos cada vez com éter de petróleo e centrifugada rapidamente a 1.000 rpm, para decantação dos detritos de tecido. O sobrenadante, contendo os lipídios totais diluídos no éter de petróleo, foi transferido para tubos de vidro, previamente, pesados em balança analítica. Após total evaporação do solvente, em capela de exaustão à temperatura ambiente, os frascos foram pesados, novamente, obtendo-se o conteúdo de gordura. Os resultados foram expressos como g de lipídio/100 g de carcaça.

Para a dosagem de proteínas, foi utilizado o método descrito por Lowry *et al.* (1951). Em síntese, alíquotas em triplicata do mesmo homogenato de carcaça, aproximadamente 1g, foram aquecidas a 37°C por uma hora em 0.6N KOH sob agitação constante. Após clarificação por centrifugação, o conteúdo de proteína total foi medido, espectrofotometricamente, pelo método de Bradford usando o reagente da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA), que tem como referência a albumina de soro bovino. Uma curva de concentrações de albumina foi utilizada como fator de ajuste.

4.5 Análise da expressão proteica de IL-6R α , IL-10R α , AdipoR1, p-IKBA α , p-NFkB-p50 e p-NFkB-p65 por Western Blotting

Para análise da expressão proteica de IL-6R α , IL-10R α , AdipoR1, p-IKBA α , p-NFkB-p50 e p-NFkB-p65, o tecido muscular sóleo (200mg) e o fígado (150mg) foram colocados em 1,0 ml de tampão específico, preparado e aquecido no dia do experimento, para extratos totais tendo a seguinte composição: Trizma base 100 mM pH 7.5, EDTA 20 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM,

ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil) 2 mM e 0.1 mg de aprotinina por mL.

Os tecidos foram, rapidamente, homogeneizadas utilizando um politron, em seguida, adicionou-se 800 µL de 1% Triton X-100 e aguardou-se 30 minutos. Em seguida, o homogenato foi centrifugado por quarenta minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi mantido em gelo e o teor de proteínas totais determinado pelo método de Bradford usando o reagente da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA), que tem como referência a albumina de soro bovino.

As amostras foram adicionadas ao tampão de Laemmli, azul de bromofenol 0,01%, fosfato de sódio 50 mM, glicerol 25%, SDS 1%, na proporção de 4: 1, contendo 100 mM de DTT. O volume de 50 µg de proteína foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose por um hora e meia (4 géis) a 15 V em um aparato de transferência semiseca (Bio-Rad, Hercules, Califórnia). A membrana foi bloqueada 22°C por duas horas em 15 ml de solução bloqueadora, composta de solução basal, Trizma base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 50 µl/ml, contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário específico *overnight*. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora a 22°C com anticorpo secundário associado a peroxidase. O anticorpo secundário constitui sempre de uma anti-imunoglobulina dirigida contra o animal produtor de anticorpo primário. A membrana foi revelada por quimioluminescência após adição do reagente de revelação ECL (Amersham/GE) e exposta ao Fotodocumentador Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, UK). As bandas de interesse foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, USA).

4.6 Dosagem de Citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 por ELISA

Porções do RET (0,3 g), fígado (0,1 g), EDL e SOL (0,1 g) foram homogeneizados em 800 mL de tampão de extração frio (100 Trizma mM, pH Base de dados de 7,5; EDTA 10 mM; NaF 100 mM; 10 mM de Na₄P₂O₇; Na₃VO₄ 10 mM; 2 mM de PMSF, 0,1 mg / ml de aprotinina). Após homogeneização, 80 µl de 10% de

Triton X-100 foram adicionados a cada amostra. Estas amostras foram mantidas em gelo durante 30 minutos e depois centrifugadas (20.817 g, 40 minutos, 4°C). O sobrenadante foi guardado, e as concentrações de proteína foram determinadas usando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia) com albumina de soro bovino como uma referência. Avaliação quantitativa de TNF- α , IL-6 e IL-10 proteínas foi realizada utilizando ELISA (DuoSet ELISA, R & amp; D Systems, Minneapolis, MN, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram testadas em duplicata, e o valor médio é relatado.

4.7 Análise dos níveis de DNA genômico para *Lactobacillus* spp.

O DNA genômico das amostras de fezes do cólon e ceco foi extraído com o Minikit QIAmp DNA Stool (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm e 230nm para a obtenção da concentração de DNA/ μ L. O grau de pureza foi estimado pela relação 260/280nm que deve variar entre 1.8 e 2.0 para ácidos nucleicos. Todas as amostras foram mantidas a -80oC. 28 Níveis relativos de DNA genômico para as bactérias intestinais foram quantificados utilizando-se a técnica de PCR-RT por meio do equipamento ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O método de detecção foi com a utilização do fluoróforo SyberGreen (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a análise da microbiota intestinal utilizamos como controle a quantificação de todas as bactérias (all bacteria). As informações foram gravadas com o software Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 2. Sequência de iniciadores diretos (forward) e reversos (reverse) usados em PCR real time para DNA genômico de bactérias

	Iniciadores
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: 5' AGCAGTAGGGAATCTTCCA 3' R: 5' CACCGCTACACATGGAG 3'
All Bacteria	F: 5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'

Os resultados foram obtidos usando o software Sequence Detector (Applied Biosystems) e são expressas como um aumento relativo, utilizando o método do 2- $\Delta\Delta$ Ct descrito por Livak & Schmittgen (2001).⁽¹⁴²⁾

4.8 Análise dos níveis séricos de TNF- α

A concentração de TNF- α no soro foi analisada utilizando MILLIPLEX MAP 96-well Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit (Millipore, Billerica, MA, EUA). Todos os procedimentos necessários para essa análise foram realizados pelo Instituto Genese de Análises Científicas (IGAC, São Paulo, Brasil). As recomendações do fabricante, que são listados no protocolo que acompanha o produto, foram seguidos para a análise. O ensaio não detectou as concentrações de IL-6 e IL-10 (interleucina-10) citocinas; Assim, somente a concentração sérica de TNF- α foi apresentada nos resultados.

4.9 LPS, Ácidos Graxos Livres e Citocinas por ELISA

A dosagem sérica de LPS foi realizada utilizando-se o Kit de teste cromogênico quantitativo para detecção de endotoxina, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (QCL- 1000 assay, Lonza, Walkersville, MD, USA). As amostras de soro foram diluídas 10 vezes com água apirrogênica e então incubadas em tubos livres de pirógenos a 75°C por 5 minutos. Todos os materiais utilizados no teste foram previamente autoclavados para torná-los livres de pirógenos e evitar interferência no teste. A curva padrão usada no teste foi gerada por concentrações conhecidas de LPS advindos da *Escherichia coli* O111:B4.

Para a determinação dos ácidos graxos livres no soro, as amostras foram diluídas 20 vezes e foi utilizado o Kit 96-well Serum/Plasma Fatty Acid Kit Non-Esterified Fatty Acids Detection 500 Point Kit (Zenbio Inc., Research Triangle Park, NC, USA).

4.10 Análise bioquímica e hormonal

As concentrações de glicose no soro, triacilglicerol, colesterol total e HDL-colesterol foram analisados por meio de kit colorimétrico enzimático comercial (labtest, Brasil). As concentrações de insulina, a grelina, NPY, leptina e adiponectina foram quantificadas utilizando kits específicos ligados à enzima ensaio imunoabsorvente (ELISA) (Linco Research, EUA).

4.11 Análise estatística

Os resultados analisados por meio do software StatsDirect, foram expressos como média $\pm$ EPM e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e ao teste *post hoc* de Tukey para o estudo dos animais com noventa dias de vida. Teste t de *Student* para amostras não pareadas para o estudo das ratas aos vinte e um dias de lactação. O nível de significância adotado foi $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta tese serão apresentados na forma de dois trabalhos científicos.

ARTICLE 1

TITLE:

**EFFECT OF OLIGOFRUCTOSE (10%) SUPPLEMENTATION DURING
PREGNANCY AND LACTATION ON METABOLISM AND INFLAMMATORY
PARAMETERS IN DAMS AND 90 DAYS OLD OFFSPRING**

ABSTRACT

Background. It has a positive correlation between the development of metabolic diseases and the changes in the gut microbiota and production of pro-inflammatory cytokines. Prebiotic intake may alter the intestinal environment and presenting antiinflammatory properties. The present study aims to evaluate the effect of a diet supplemented with OF (10%) during gestation and lactation on metabolic parameters and inflammatory lactating rats and ninety days old offspring, concerning endotoxemia, metabolic and inflammatory parameters. **Methods:** On the first day of pregnancy, the rats were divided into two groups: control diet (C) and control diet supplemented with 10% oligofructose (OF). The diets were maintained during pregnancy and lactation. In the twenty-first day of lactation animals were weaned and mothers euthanized. Part of the puppies were euthanized immediately and the others were kept in individual cages within ninety days of life. The blood, bowel, retroperitoneal adipose tissue (RET), parametrial fat mothers and epididymal of puppies, liver, soleus muscle tissues and EDL were collected. The serum was used for measuring lipopolysaccharide (LPS), free fatty acids (FFA), TNF- α , hormones, insulin, Ghrelin, adiponectin and NPY as well as cytokines by specific kits. The liver, and soleus and EDL RET muscle tissue were used for determination of cytokine content by specific kits. The liver and soleus muscle tissue were placed in a specific buffer to perform Western blotting. Genomic DNA Bacteria present in the colon feces was determined by real time PCR. **Results.** Supplementation with 10% of oligofructose during pregnancy and lactation reduced body weight gain, maternal dietary intake and serum adiponectin levels. In ninety days old offspring, maternal supplementation of oligofructose (10%) promoted increased IL-6 content and protein expression of IL-6R, and reduced protein expression of ADIPO-R1 in the soleus muscle. **Conclusion.** Intake of 10% oligofructose during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in dams and offspring associated with a decrease in mother's serum adiponectin, an increased IL-6 content, IL-6R protein expression and reduced Adipo-R1 protein expression in soleus muscle of 90 days old offspring. Further studies should investigate the dose-response effect of oligofructose

supplementation during pregnancy and lactation on the development, metabolism, endotoxemia and inflammatory mechanisms in dams and pups.

INTRODUCTION

Maternal nutrition plays an important role in metabolic and hormonal interactions between the fetus, the placenta and the mother. Maternal nutritional status is directly related to with maternal metabolism and the fetal growth and there are several evidences indicating the influence of nutritional and hormonal environment during intrauterine life and its impact on adult life. Adaptive response to nutritional conditions, the fetal period may modify the metabolic programming due to genetic susceptibility and rapid cell division during this period, resulting in persistent and lasting effects into adulthood. The degree of metabolic change in the program depends on the genetic background, the period and intensity of exposure to factors that influence this setting, the response may be varied between individuals.^(1,2)

Other important issue, abnormal weight gain during the pregnancy puts the mother into increased risk of serious health problems such as risk of cesarean delivery, delivery complications, preeclampsia, and postpartum weight retention and therefore, increasing the long-term risk of weight-associated diseases.⁽³⁾ Pregnancy is a period where an increase in food intake occurs and thus the susceptibility to the development of obesity is increased. Dietary fiber supplementation is thought to attenuate food intake through several mechanisms; however, the most widely reported mechanism with oligofructose is modification of satiety hormone response.^(4,5)

Prebiotics are fermented by the colonic bacteria and can alter the intestinal environment (bacterial population, intestinal permeability) concentrations.⁽⁶⁾ Oligofructose, fructooligosaccharides and inulin are members of the inulin-type fructans group. Oligofructose is considered synonym for inulin-type fructans with a maximum degree of polymerization (DP) of less than 10.⁽⁷⁾ In addition, due to the β -configuration, oligofructose and other inulin-type fructans are hydrolyzed and fermented by the colonic microbiota rather than being digested in the upper gastrointestinal tract, with health benefits to the host. Thus, the inulin-type fructans are considered dietary fibers and prebiotics.^(8,9)

It has been established that there is a positive correlation between the development of metabolic diseases and the changes in the gut microbiota and production of pro-inflammatory cytokines.^(10,11) A recent study with supplementation with prebiotics such as fructooligosaccharides (FOS), showed changes in the composition of the intestinal microbiota, improving metabolic parameters of inflammation in animals treated with hyperlipidic diet. This results showed that gut bifidobacteria are lower in obesity with high-fat feeding and that supplementing the diet of mice with prebiotics restores bifidobacteria numbers and reduces metabolic endotoxaemia caused by a high-fat diet.⁽¹²⁾ Parnell & Reimer (2012) reported an increased in the *Lactobacillus spp.* levels of the 8-weeks-old obese rats fed high fiber diet (20% of inulin and oligofructose) during 10 weeks.

It is known that short chain fatty acids (SCFA) end products of microbiana fermentation, can promote alterations in intestinal permeability, thereby reducing translocation of LPS into the blood circulation.^(6,13) LPS promotes the activation of TLR4, contributing to systemic inflammation by inducing the secretion of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α ⁶. Recent evidence indicates that oligofructose is capable of inducing the production of short chain fatty acids (SCFA), which have anti-inflammatory properties.^(14,15)

The intake of probiotics and dietary fiber during pregnancy can be considered beneficial for both the mother and the child, given that bacterial colonization of the newborn occurs under strong influences of maternal intestinal microbiota.⁽¹⁶⁾ Breastfeeding is also an important period for this colonization, as through breast milk the mother transferring bacteria to the newborn.⁽¹⁷⁾

We previously showed that the maternal consumption of a control diet supplemented with OF (10%) during pregnancy and lactation is deleterious to offspring development, increases endotoxemia and promotes a pro-inflammatory effect in 21-d-old pups.^(18,19) The aim of this study was to evaluate the oligofructose supplementation and its relationship with dams and offspring's weight gain, dietary intake, biochemical and inflammatory parameters in order to progress in understanding its effects on pregnancy period and consequences to adult pups.

MATERIAL AND METHODS

Animals and treatments

The experimental research committee of the Universidade Federal de São Paulo approved all procedures for the care of the animals used in this study followed international recognized guidelines (CEUA protocol n°737014). The rats were kept under controlled conditions of light (12-h light/12-h dark cycle with lights on at 07:00) and temperature ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), with *ad libitum* water and food. Three-month-old female Wistar rats (4 animals in each group) were left overnight to mate, and copulation was verified the following morning by the presence of sperm in vaginal smears.

On the first day of pregnancy, the dams were isolated in individual cages and sequentially divided into two groups, each receiving: a control diet (C diet, Cgroup) and a control diet supplemented with oligofructose (OF diet, OF group). On the day of delivery, considered day 0 of lactation, litters were adjusted to eight pups each. The diets were maintained throughout pregnancy and 21 days of lactation. The two diets were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN- 93G)^{20,21} and were similar in calories and lipid content. The OF diet were prepared by adding 100 g/kg diet of oligofructose (Orafti P95, Pemuco, Chile). According to manufacturer, the OF used in this study is a mixture of oligosaccharides extracted from chicory root. These oligosaccharides are composed of fructose units connected by β (2–1) links. Some of these molecules are terminated by a glucose unit. The degree of polymerization (DP) of oligofructose in this supplement ranges between 2 and 8. The centesimal composition of the diets is presented in Table 1.

Experimental procedures

The dams after 21 days of lactation period and pups at 90th days of life were euthanized by decapitation. The animals were fasted for 10 hours. Trunk blood was collected and immediately centrifuged at 2500rpm for 15 minutes. The serum was separated and stored at -80°C for later determination of lipopolysaccharides (LPS),

free fatty acids (FFA), adiponectin, insulin, glucose, triacylglycerol, total cholesterol and HDL-cholesterol. Carcasses of animals were eviscerated, heavy and kept at -20°C until analysis of fat and protein content. The total lipids were extracted as described by Stansbie et al. (1976) and quantified by gravimetric method.⁽²³⁾ The retroperitoneal white adipose tissue (RET), liver, EDL and soleus muscle were isolated, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Serum determination of lipopolysaccharides

Serum concentration of LPS was performed using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay, a quantitative chromogenic test for detecting endotoxin (LAL QCL-1000 assay, Lonza, USA). Serum samples were diluted 10 times with pyrogen-free water and incubated into pyrogen-free tubes at 75°C for 5 minutes. Previously, all materials used in the test were autoclaved to render them pyrogens-free and avoid interference in the test. The standard curve used in the assay was generated by known concentrations of LPS of the strain *Escherichia coli* O111:B4.

Biochemical and hormonal serum analysis

The serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations were measured with a commercial enzymatic colorimetric kit (Labtest, Brazil). The insulin and adiponectin concentrations were quantified using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Linco Research, USA). For determination of serum free fatty acids, the samples were diluted 20 times and was used 96-well Serum/Plasma Fatty Acid Kit Non-Esterified Fatty Acids 500 Point Detection Kit (Zenbio, USA). The methodologies followed the recommendations of the manufacturer and are listed in the protocols accompanying the product.

Serum determination of TNF- α

The concentration of TNF- α in the serum was analyzed using the MILLIPLEX MAP 96-well Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit (Millipore, Billerica, MA, USA). All procedures required for this analysis were performed by the Instituto Genese de Análises Científicas (IgAc, São Paulo, Brazil). The manufacturer's recommendations, which are listed in the protocol accompanying the product, were followed for the analysis. The assay did not detect the concentrations of IL-6 and IL-10 (interleukin-10) cytokines; thus, only the TNF- α serum concentration was presented in the results.

Tissues cytokines content

Portions of the RET (0.3 g), liver (0.1 g), EDL and SOL (0.1 g) were homogenized in 800 μ L of chilled extraction buffer (100 mM Trizma Base pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 mM NaF; 10 mM Na₄P₂O₇; 10 mM Na₃VO₄; 2 mM PMSF; 0.1 mg/ml aprotinin). After homogenization, 80 μ L of 10% Triton X-100 was added to each sample. These samples were held on ice for 30 minutes and then centrifuged (20817 g, 40 minutes, 4°C). The supernatant was saved, and protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California) with bovine serum albumin as a reference. Quantitative assessment of TNF- α , IL-6 and IL-10 proteins was carried out using ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the recommendations of the manufacturer. All samples were run in duplicate, and the mean value is reported.

Genomic DNA extraction from fecal samples and real-time polymerase chain reaction (PCR-RT)

Genomic DNA from fecal samples of colon was extracted with QiagenQIAmp DNA Stool Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration was quantified in the spectrophotometer NanoDropND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EUA) and reading was performed at wave lengths of 260, 280 and 230nm for obtaining the

concentration of DNA/ μ L. The purity was estimated by 260/280nm ratio which must range between 1.8 and 2.0 for nucleic acids. All samples were maintained at -80°C.

Lactobacillus spp. was quantified by real-time polymerase chain reaction. Relative levels of lactobacillus spp. DNA were quantified in real time, using Syber Green primer in an ABI Prism7500 Sequence Detector (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative levels of the housekeeping gene all bacteria were measured. The primers used were: lactobacillus spp. 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' (sense) and 5'-CACCGCTACACATGGAG-3' (antisense) and all bacteria 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' (sense) and 5'-GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' (antisense). Results were obtained using Sequence Detector software (Applied Biosystems) and are expressed as a relative increase, using the method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ described by Livak and Schmittgen (2001).

Protein expression analysis by Western Blotting

After euthanasia, the RET, SOL, EDL and liver were removed and placed in 800 μ L of extraction buffer prepared on the day of experiment (100 mM Trizma base pH 7.5, 20 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF-phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1 mg of aprotinin per mL). The tissues, 200mg of soleus and 150mg of liver, were rapidly homogenized using a polytron, and 800 μ L of 1% Triton X-100 was then added. After 30 minutes, the homogenate was centrifuged at 14000 rpm for 40 minutes at 4°C. The supernatant was maintained on ice, and the total protein content was determined by the Bradford method using the Bio-Rad reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin (BSA) as reference.

The samples were treated with Laemmli buffer (0.01% bromophenol blue, 100 mM sodium phosphate pH 7.0, 50% glycerol, 10% SDS) at a ratio of 4:1 containing 100 mM DTT (dithiothreitol). The proteins (50 μ g) were boiled for 5 min before loading onto 10% SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membrane was performed for 90 minutes/4 gels at 15 V (constant) in a Bio-Rad semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nonspecific protein binding to the

nitrocellulose membrane was reduced by overnight pre-incubation at 22°C in blocking buffer composed of basal solution (100 mM Trizma base pH 7.5, 500 mM NaCl, Tween 20 0.02%) containing 1% BSA.

The nitrocellulose membranes were incubated overnight at 22°C with antibodies against NFκB p50 in the phosphorylated form (p-NFκB p50), IL-6Rα, IL-10Rα and ADIPOR1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and NFκB p65 in the phosphorylated form (p-NFκB p65), α-Tubulin and β-Tubulin (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA). Antibodies were diluted in 1:1000 (Santa Cruz) or 1:5000 (Cell Signaling) with blocking buffer and then washed for 30 min in basal solution. The blots were subsequently incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at 22°C. To evaluate protein loading, membranes were stripped and reblotted with an anti-β-tubulin antibody as appropriate. Specific bands were detected by chemiluminescence following ECL reagent addition (Amersham/ GE), and the visualization/capture was performed by exposure to Alliance 4.7 equipment (Uvitec, Cambridge, UK). Band intensities were determined by optical densitometry (Scion Image- Release Beta 3b, NIH, USA).

Statistical analysis

All results are analysed by StatsDirect software and presented as mean ± standard error of the mean. Statistical significances of the differences between the means of the two groups of samples were assessed using Student's *t* test. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Maternal weight gain and dietary intake

The body weight gain during pregnancy was significantly lower in the oligofructose group compared to control and remained with lower body weight by the end of the lactation period (Figure 1A and 1B). The group that received diet containing oligofructose (OF) during pregnancy and lactation had a lower food intake compared with the control (C) group (Figure 1C and 1D).

Maternal relative tissue's weight, carcass fat and protein content

The retroperitoneal adipose tissue in the OF was significantly lower than the C ($p < 0.001$) group. Weight of liver, EDL and soleus muscle also the carcass protein content did not differ between groups. However, the carcass fat content in the OF was significantly lower than the C group (Table 2).

Maternal serum analyses and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels

Serum concentration of insulin, glucose, LPS, FFA, NPY and triacylglycerol did not differ between the C and OF groups after 21 days of lactation. However, the OF diet promoted a significant decrease of adiponectin serum concentration and increased ghrelin, HDL and total cholesterol without change the ratio of total cholesterol/HDL (Table 3).

Lactobacillus spp. genomic DNA levels on fecal colon content did not differ between C and OF groups (Table 3).

Maternal tissue's cytokine content

The IL-6 content in the RET was higher in the OF group than in the C ($p = 0.0018$) (Figure 2A). The IL-10 and TNF- α content did not differ among the groups in

all studied tissues (figure 2 B e C). The IL-10/TNF- α ratio of the soleus was lower in the OF than in C and in the RET this ratio was higher in OF when compared to control group (Figure 2D).

Offspring's weight gain and dietary intake

Pup's body weight in OF-C group was lower than C-C (Figure 3A), from 21 to 56 days of life and nose-to-anus length from 21 to 70 days of life (Figure 3C), but there was no statistical difference between these two groups at 90 days of life. The Lee index was higher in OF-C group at 21 d/old pups, but there was no statistical difference between these two groups from 28 to 90 days of life (Figure 3D). Dietary intake was lower in the OF-C group only at 35 days of life offspring, but the same was not observed in the 42 to 90 days of age (Figure 3B).

The metabolic efficiency was higher in OF-C group compared to the C-C in offspring at 28, 35, 46, 70 and even 90 days old (Figure 3E), since the amount of food intake was lower in relation to body weight gain.

Offspring's relative tissue weight, carcass fat and protein content

The content of fat and carcass protein was similar in 90 days old puppies, as well as the relative weight of the liver, epididymal and retroperitoneal adipose tissue, muscle tissue EDL and soleus (Table 4).

Offspring's serum analyses and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels

Serum concentration of LPS, leptin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerol, Total Cholesterol, HDL-Cholesterol and Cholesterol total/HDL Ratio did not differ between the C-C and OF-C groups. However, the OF maternal diet promoted a significant decrease of TNF- α , NPY and a increased ghrelin in the 90 days/old puppies. *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal colon content did not differ between C and OF-C groups (Table 5).

Offspring's tissue cytokine content

The IL-6 content in the soleus muscle was higher and a tendency to increase of IL-10 content ($p = 0.055$) in the OF-C group than in the C-C (Figure 4A), but the content of TNF- α content and IL-10/TNF- α ratio was similar to that tissue. In RET, liver and EDL, the IL-6, IL-10, TNF- α content and IL-10/TNF- α ratio did not differ among the groups (Figure 4A, B, C and D).

Offspring's tissue protein expression

The protein expression of IL-6R α was increased and Adipo-R1 decreased in soleus muscle of OF-C when compared with C-C (Figure 5 B and C). A tendency to lower protein expression of IL-10R α (Figure 5A) was also observed in OF-C group in that tissue ($p=0.065$). No changes were observed in protein expression of p-NFkB-p50, p-NFkB-p65 and p-IKBA (Figure 5 D, E and F).

In the liver, no changes were observed in protein expression of IL-10R α (Figure 6A), Adipo-R2 (Figure 6B), p-NFkB-p50 (Figure 6C) p-NFkB-p65 (Figure 6D) and p-IKBA (Figure 6E).

DISCUSSION

In the present study, supplementation with 10% oligofructose during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in dams (Figure 2) and decreased the dietary intake and body weight gain (Figure 1) during pregnancy and lactation.

Dietary fiber supplementation is thought to attenuate food intake through several mechanisms; however, the most widely reported mechanism with oligofructose is modification of satiety hormone response.^(4,5) The intestinal mucosa, primarily in the distal ileum, caecum and colon, contains endocrine L-cells that secrete peptides in response to nutrient stimulus. Of particular interest, with respect to weight loss, are the two L-cell-derived anorexigenic peptides, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY).⁽²⁵⁻²⁷⁾

Human trials specifically evaluating oligofructose supplementation for weight loss. Parnell & Reimer (2009) released a randomized, double-blind, placebo controlled trial with forty-eight otherwise healthy adults with a body mass index (in kg/m²) > 25 receiving 21 g oligofructose per day for 12 weeks. Independently of any other lifestyle changes, oligofructose supplementation reduced body weight and chiefly body fat. These results were associated with an amplified suppression of postprandial ghrelin and stimulation of PYY and an observed significant lowering of food intake. Ghrelin is also thought to play a role in increasing adiposity. Given that administration of ghrelin reduces fat utilization⁽²⁹⁾, it is plausible that lower circulating concentrations may alleviate the downward pressure on fat oxidation seen in obesity and in turn enhance lipolysis.⁽³⁰⁾ Ghrelin, which is acylated via the activation of ghrelin O-acyltransferase (GOAT)^(31,32), has also been shown to decrease in response to prebiotic supplementation in rats^(33,34) and human subjects⁽²⁶⁾, therefore, supplementation with these fibers lowers the energy content of the diet.

On the other hand, Desbuides *et al.* (2011), showed that prebiotic (4%) supplementation did not affect neither body weight gain nor food intake during pregnancy. Parnell & Reimer (2010) showed that a high fiber diet (10% and 20% of inulin and oligofructose) during 10 weeks not influences the body weight and the fat

mass in 8-weeks-old rats. Similarly, Rodenburget *al.* (2008) reported no difference in body weight gain of eight-week-old rats fed a diet containing 6% of FOS for 16 days.

Recently, Paul et al. (2016) in his study with Sprague-Dawley rats induced to obesity by diet rich in sucrose and fat, evaluated the effect of maternal supplementation of oligofructose 10%. The prebiotic intake improved maternal metabolism, increased intestinal hormones related to the reduction of food intake, PYY and GLP-1 and GLP-2 in mothers and twenty one days old offspring. In summary, the authors concluded that supplementation of oligofructose 10% during pregnancy and lactation improves maternal metabolism in obese rats induced by diet, so that attenuates the metabolic programming associated with maternal obesity.⁽³⁸⁾

In the present study OF diet promotes an increase of serum ghrelin after ten hours of fasting in the dams after twenty one days of lactation and ninety days old offspring (Table 3 and 5). The increases of ghrelin may be associated with reward mechanisms generated by the low weight gain, reduction of adipose tissue and the retroperitoneal adipose tissue in the OF group.

Previously we had shown that supplementation of the dam's diet with 10% oligofructose during pregnancy and lactation reduced the offspring's body weight, body weight gain, length and lipid carcass content.⁽¹⁸⁾ In the present study, we had shown that the offspring of mothers fed 10% oligofructose diet had lower body weight and length compared to the control group (Figure 3A and C) up to 56 and 70 days old respectively. This changes in body weight and length was not observed in the ninety days old offspring (Figure 3). This could be explained by the increased metabolic efficiency presented by the offspring until 90 days of life, because, despite the increase in serum ghrelin levels and decreased NPY observed in this group, there was no changes in food intake when compare to control group (Figure 3E).

The SCFA promotes alterations in intestinal permeability, thereby reducing translocation of LPS into the blood circulation.^(6,13) The oligofructose (OF) appear to induce the production of SCFA, acetate, propionate and butyrate, which have anti-inflammatory properties.^(14,15) The administration of 10 g/d oligofructose-enriched inulin for 8 weeks decreased the serum concentrations of LPS, IL-6 and TNF- α in patients with type 2 diabetes.⁽³⁹⁾ Moreover, Cani et al. (2007) showed that mice fed a

high-fat diet combined with OF during 14 weeks presented a decrease in endotoxemia and IL-6 plasma levels.

On the other hand, we previously shown a increased levels of TNF- α and IL-10 in the RET and decreased the serum levels of adiponectin of the 21 days old pups of mothers who received oligofructose supplementation (10%).⁽¹⁸⁾ In addition, we also observed in this group an increase in RNA for IL-R6 in the liver and RET, as well as a reduction of mRNA for Adipo-R2 liver, Adipo-R1 soleus muscle tissues and EDL.

In the present study the OF diet promoted in dams a decrease of adiponectin serum concentration (Table 3) and an increased IL-6 content in the RET when compared to control group (Figure 2 A). Furthermore, the IL-10/TNF- α ratio of the RET was greater in the OF that of the C and in the soleus muscle this ratio was decreased when compared to control group (Figure 2D). These results indicate that supplementation of the dam's diet with a high oligofructose content (10%) induced a pro-inflammatory state in the dams.

Wang & Trayhurn (2006) reported an increased TNF- α concentrations associated with a decrease in the expression and secretion of adiponectin. Adiponectin has anti-inflammatory and anti-atherogenic effects, increases insulin sensitivity and anti-inflammatory properties because it inhibits the expression of vascular adhesion molecules and pro-inflammatory cytokines.^(41,42) A recent study showed in 3T3-L1 adipocytes treated with adiponectin in the presence of LPS a decrease in IL-6 levels and both NF κ B p50 and NF κ B p65 nuclear activity.⁽⁴³⁾ In the present study the OF diet did not alters the serum concentration of insulin and glucose, despite the decrease of adiponectin serum concentration, but promotes a pro-inflammatory effect.

In ninety days old puppies, maternal diet containing 10% of oligofructose promoted increased IL-6 content in the soleus muscle tissue, increased protein expression of IL-6R α and reduction of protein expression Adipo-R1, and a tendency to reduction of IL-10R α expression in the same tissue (Figure 6). Nevertheless, the serum level of TNF- α was lower in this group when compared with to control (Table 5). Recently, Koren et al. (2012) observed in the third trimester of pregnancy a dramatic remodeling of the maternal gut microbiota. An enrichment of Proteobacteria and Actinobacteria is observed and an abundance of health-related

bacteria are impacted. The author showed that *Faecalibacterium*, which is a butyrate producer with anti-inflammatory effects, is decreased in third trimester of pregnancy.⁽⁴⁴⁾ Furthermore, the authors observed that, in the majority of women in third pregnancy trimester, an increase in the abundance of Proteobacteria, which has been observed inflammation-associated dysbioses.⁽⁴⁵⁾ In the present study, no differences in the genomic DNA of *Lactobacillus* spp. was observed in colon of mothers, but the inflammatory condition observed by Koren *et al.* during pregnancy may explain the present results that oligofructose (10%) supplementation during pregnancy and lactation period exerts different effects from those observed by other researchers with humans and animals in other stages of life.^(14,15,39, 44)

Hachul *et al.* (2013) related the supplementation of diet with 10% OF during pregnancy and lactation with diarrhea in dams. This effect should have contributed to development of pro-inflammatory environment observed in the offspring and an alteration of bacterial population, through an increase in bacterial translocation and intestinal permeability could cause an increase in serum LPS, resulting in TLR4-mediated inflammatory responses.⁽⁶⁾ Nevertheless, serum concentration of LPS in the dams did not differ between the C and OF groups after 21 days of lactation (Table 2), nor in offspring at 90 days old (Table 5). The pro-inflammatory effects in the offspring occurred independent of the elevation in the dams or pup's serum endotoxin levels, with increased pro-inflammatory cytokine production and decreased the adiponectin levels.

CONCLUSION

In conclusion, supplementation with 10% oligofructose during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in dams and offspring associated with a decrease in mother's serum adiponectin, an increased IL-6 content, IL-6R protein expression and reduced Adipo-R1 protein expression in soleus muscle of 90 days old offspring. Further studies should investigate the dose-response effect of oligofructose supplementation during pregnancy and lactation on the development, metabolism, endotoxemia and inflammatory mechanisms in dams and pups.

REFERENCES

1. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal Clinical Nutrition* 1999; 69: 179-197.
2. Barker DJP: In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998, 95(2):115- 128.
3. Farajzadegan Z, Pozveh ZA. The design of maternal centered life-style modification program for weight gain management during pregnancy - a study protocol. *J Res Med Sci.* 2013 Aug;18(8):683-7.
4. Parnell JA, Reimer RA: Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 2012.107(4):601-13.
5. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr* 2005;93(suppl): S157–61.
6. Nakamura YK, Omaye ST: Metabolic diseases and pro- and prebiotics: mechanistic insights. *Nutr Metab (Lond)* 2012, 9:60.
7. Carabin IG, Flamm WG: Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999, 30:268–282.
8. Roberfroid MB: Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* 2005, 93:S13–S25.
9. Kaur N, Gupta AK: Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 2002, 27:703–714.
10. Gebauer SK, Psota TL, Kris-Etherton PM. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids.* 2007; 42: 787–799.
11. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 606–612.

12. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2374-83.
13. Kelly G. Inulin-type prebiotics—a review: part 1. *Altern Med Rev*. 2008; 13: 315–329.
14. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2011; 45 Suppl: S120–127.
15. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15: 474–479.
16. Champ M, Hoebler C. Functional food for pregnant, lactating women and in perinatal nutrition: a role for dietary fibres? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12: 565–574.
17. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013; 69: 1–10.
18. Hachul AC, Mennitti LV, de Oliveira JL, Moreno MF, Okuda MH, Dos Santos B, Oyama LM, Ribeiro EB, do Nascimento CM, Pisani LP. Oligofructose supplementation (10%) during pregnancy and lactation does not change the inflammatory effect of concurrent trans fatty acid ingestion on 21-day-old offspring. *Lipids Health Dis*. 2013 May 1;12:59.
19. Mennitti LV, Oyama LM, de Oliveira JL, Hachul AC, Santamarina AB, de Santana AA, Okuda MH, Ribeiro EB, do Nascimento CM, Pisani LP. Oligofructose supplementation during pregnancy and lactation impairs offspring development and alters the intestinal properties of 21-d-old pups. *Lipids Health Dis*. 2014 Feb 5;13:26.

20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11):1939-51.
21. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* 1997; 127(5 Suppl):838S-841S.
22. Stansbie D, Denton RM, Bridges BJ, Pask HT, Randle PJ. Regulation of pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase activity in rat epididymal fat-pads. Effects of starvation, alloxan-diabetes and high-fat diet. *Biochem J.* 1976; 154(1):225-36.
23. Oller do Nascimento CM, Williamson DH. Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. *Biochem J.* 1986; 239: 233-236.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402–408.
25. Gevrey JC, Malapel M, Philippe J, Mithieux G, Chayvialle JA, Abello J, Cordier-Bussat M. Protein hydrolysates stimulate proglucagon gene transcription in intestinal endocrine cells via two elements related to cyclic AMP response element. *Diabetologia.* 2004 May;47(5):926-36.
26. Cordier-Bussat M, Bernard C, Levenez F, Klages N, Laser-Ritz B, Philippe J, Chayvialle JA, Cuber JC. Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. *Diabetes.* 1998 Jul;47(7):1038-45.
27. Drucker DJ. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology.* 2002 Feb;122(2):531-44.

28. Parnell, JA & Reimer, RA. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1751–9.
29. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908–13.
30. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 2006;116:1983–93.
31. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):387-96.
32. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29;105(17):6320-5.
33. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr* 2004;92:521–6.
34. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005 Jun;13(6):1000-7.
35. Desbuauds N, Goubeyre P, Haure-Mirande V, Darmaun D, Champ M, Bodinier M. Impact of perinatal prebiotic consumption on gestating mice and their offspring: a preliminary report. *Br J Nutr*. 2011 Sep 12:1-4.
36. Parnell JA, Reimer RA: Effect of prebiotic fibre supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: a dose-response study in JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 2010.103(11):1577-84.
37. Rodenburg W, Keijer J, Kramer E, Vink C, van der Meer R, Bovee-Oudenhoven IM: Impaired barrier function by dietary fructo-oligosaccharides (FOS) in rats is

accompanied by increased colonic mitochondrial gene expression. *BMC Genomics* 2008, 9:144.

38. Paul HA, Bomhof MR, Vogel HJ, Reimer RA. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. *Sci Rep.* 2016 Feb 12;6:20683.

39. Dehghan P, Pourghassem Gargari B, Asghari Jafar-abadi M. Oligofructose-enriched inulin improves some inflammatory markers and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial. *Nutrition.* 2014; 30: 418–423.

40. Wang B, Trayhurn P: Acute and prolonged effects of TNF- α on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch* 2006, 452(4):418–427.

41. Díez JJ, Iglesias P: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003, 148(3):293–300.

42. Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie.* 2012; 94: 2143–2149.

43. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, et al. Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine.* 2012; 57: 98–106.

44. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, Gonzalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Bäckhed F, Isolauri E, Salminen S, Ley RE. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell.* 2012 Aug 3;150(3):470-80.

45. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Feb 21;9(4):219-30.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Composition of the control diet and control diet supplemented with oligofructose according to AIN-93.

Diet (g/100g)		
Ingredient	C	OF
Casein*	20.0	20.0
L-cystine†	0.3	0.3
Cornstarch†	62.0	52.0
Soybean oil‡	8.0	8.0
Butylhydroquinone†	0.0014	0.0014
Mineral mixture§	3.5	3.5
Vitamin mixture#	1.0	1.0
Cellulose†	5.0	5.0
Choline bitartrate†	0.25	0.25
Oligofructose£	-	10.0

*Casein was obtained from Labsynth, São Paulo, Brazil.

†L-cystine, cornstarch, butylhydroquinone, cellulose and choline bitartrate were obtained from Viafarma, São Paulo, Brazil.

‡Oil was supplied from soybean (Lisa/Ind. Brazil).

§Mineral mix 9mg/kg diet): calcium, 5000; phosphorus, 1561; potassium, 3600;sodium, 1019; chloride, 1571; sulfur, 300; magnesium, 507; iron, 35; copper,6.0; manganese, 10.0; zinc, 30.0; chromium, 1.0; iodine 0.2; selenium, 0.15;fluoride, 1.00; boron, 0.50; molybdenum, 0.15; silicon, 5.0; nickel, 0.5; lithium,0.1; vanadium, 0.1 (AIN-93G, mineral mix, Rhostrer, Brazil).

#Vitamin mix (mg/kg diet): thiamin HCL, 6.0, riboflavin, 6.0; pyridoxine HCL 7.0;niacin, 30.0; calcium pantothenate, 16.0; folic acid, 2.0; biotin, 0.2; vitamin B12,25.0; vitamin A palmitate 4000 IU; vitamin E acetate, 75; vitamin D3, 1000 IU; vitamin KI, 0.75. (AIN-93G, vitamin mix, Rhostrer, Brazil).

£Oligofructose (P95) was manufactured by Orafiti (Pemuco, Chile) and was obtained by Viafarma, São Paulo, Brazil.

Table 2. Body composition and tissues weight of the dams

	Control	Oligofructose
Carcass protein (g/100g)	16.77 ± 0.89	15.16 ± 0.77
Carcass fat (g/100g)	9.15 ± 0.32	6.12 ± 0.94*
Retroperitoneal relative weight (g/100g)	0.83 ± 0.06	0.42 ± 0.10 *
EDL muscle relative weight (g/100g)	0.21 ± 0.17	0.18 ± 0.13
Soleus muscle relative weight (g/100g)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Liver relative weight (g/100g)	3.51 ± 0.40	3.38 ± 0.37
Parametrial relative weight (g/100g)	1.24 ± 0.09	1.10 ± 0.09

Data shown as mean±SE. * p<0.0001, versus C. (Carcass content n=7; Tissues weight n=10)

Table 3. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the dams and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon of the pups at 90 days of life

	Control	Oligofructose
LPS ([EU]/mL)	13.06 ± 1.96	9.78 ± 2.60
NPY (ng/mL)	1.60 ± 0.11	1.53 ± 0.09
Ghrelin (ng/mL)	2.70 ± 0.34	6.12 ± 1.08*
Adiponectin (pg/mL)	48.44 ± 10.26	29.24 ± 3.47 *
Insulin (µg/mL)	0.62 ± 0.05	0.51 ± 0.04
Glucose (mg/dL)	93,55 ± 3,56	97,26 ± 0,98
FFA (µM)	2509 ± 240.6	2082 ± 229.0
Triacylglycerol (mg/dL)	98.10 ± 2.54	95.02 ± 4.09
Total Cholesterol	84.85 ± 3.50	107.08 ± 5,70*
HDL-Cholesterol (mg/dL)	43.47 ± 3.81	56.04 ± 3.81*
Cholesterol total/HDL Ratio	2.01 ± 0.10	1.98 ± 0.11
<i>Lactobacillus</i> spp. genomic DNA level	100 ± 21.77	168.33 ± 72.66

Serum results are showed as mean±SE (n=10). Results of *Lactobacillus* spp. are expressed in arbitrary units, stipulating 100 as the control value (n=5). * p<0.05, versus C.

Table 4. Body composition and tissues weight of the pups at 90 days of life

	C-C	OF-C
Carcass protein (g/100g)	14.23 ± 0.51	15.06 ± 0.27
Carcass fat (g/100g)	9.75 ± 1.22	10.19 ± 1.17
Retroperitoneal relative weight (g/100g)	2.16 ± 0.14	2.29 ± 0.10
Liver relative weight (g/100g)	3.11 ± 0.12	2.97 ± 0.05
EDL muscle relative weight (g/100g)	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Soleus muscle relative weight (g/100g)	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.00
Epididymal relative weight (g/100g)	2.04 ± 0.28	1.80 ± 0.15
Data shown as mean±SE. * p<0.05, versus C (Carcass content n=7; Tissues weight n=10)		

Table 5. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the C-C and OF-C group and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon

	C-C	OF-C
LPS ([EU]/mL)	4.99 ± 1.10	4.66 ± 1.63
TNF- α	11.06 ± 1.02	5.67 ± 1.81*
NPY (ng/mL)	1.63 ± 0.06	1.41 ± 0.07**
Ghrelin (ng/mL)	0.70 ± 0.09	1.53 ± 0.21*
Leptin (pg/mL)	9.38 ± 2.08	12.00 ± 2.65
Insulin (μ g/mL)	1.29 ± 0.18	1.04 ± 0.13
Glucose (mg/dL)	94,23 ± 3,31	95,37 ± 1,17
FFA (μ M)	2435.14 232.56	2435.66 ± 194.0
Triacylglycerol (mg/dL)	111,21 ± 2,10	110,02 ± 1,98
Total Cholesterol	144.1 ± 14.24	148.20 ± 10.05
HDL-Cholesterol (mg/dL)	47.96 ± 1.7	46.38 ± 1.22
Cholesterol total/HDL Ratio	3.07 ± 0.22	3.10 ± 0.24
<i>Lactobacillus</i> spp. genomic DNA level	100 ± 43.43	199.98 ± 42.71

Data shown as mean $\pm$ SE. * p<0.05 ** p=0.05, versus C. (n=10)

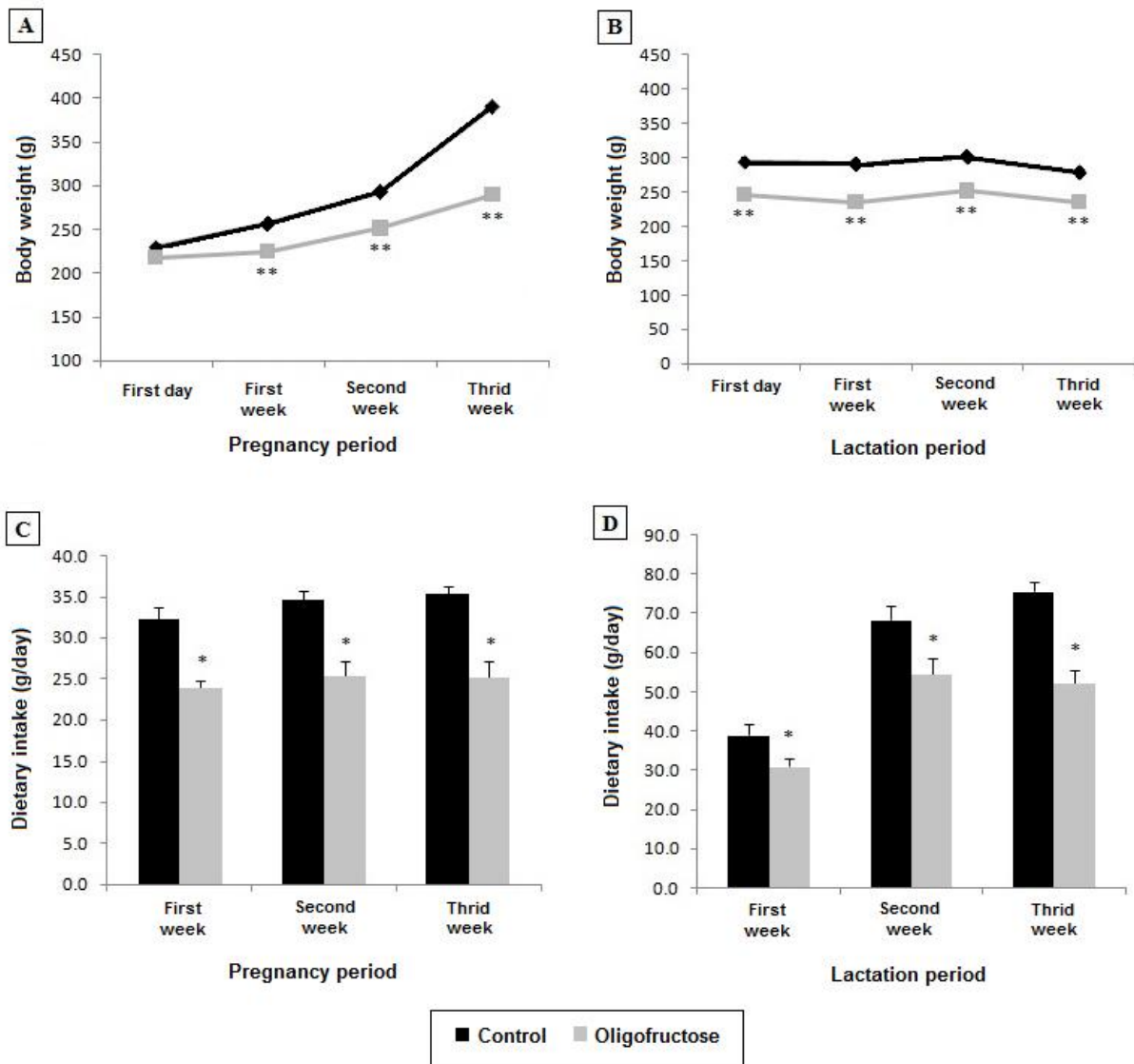


Figure 1. Body weight and dietary intake during pregnancy (A, C) and lactation period (B, D). Data shown as mean±SE. * $p < 0.05$, versus C and ** $p < 0.01$, versus C (n=10).

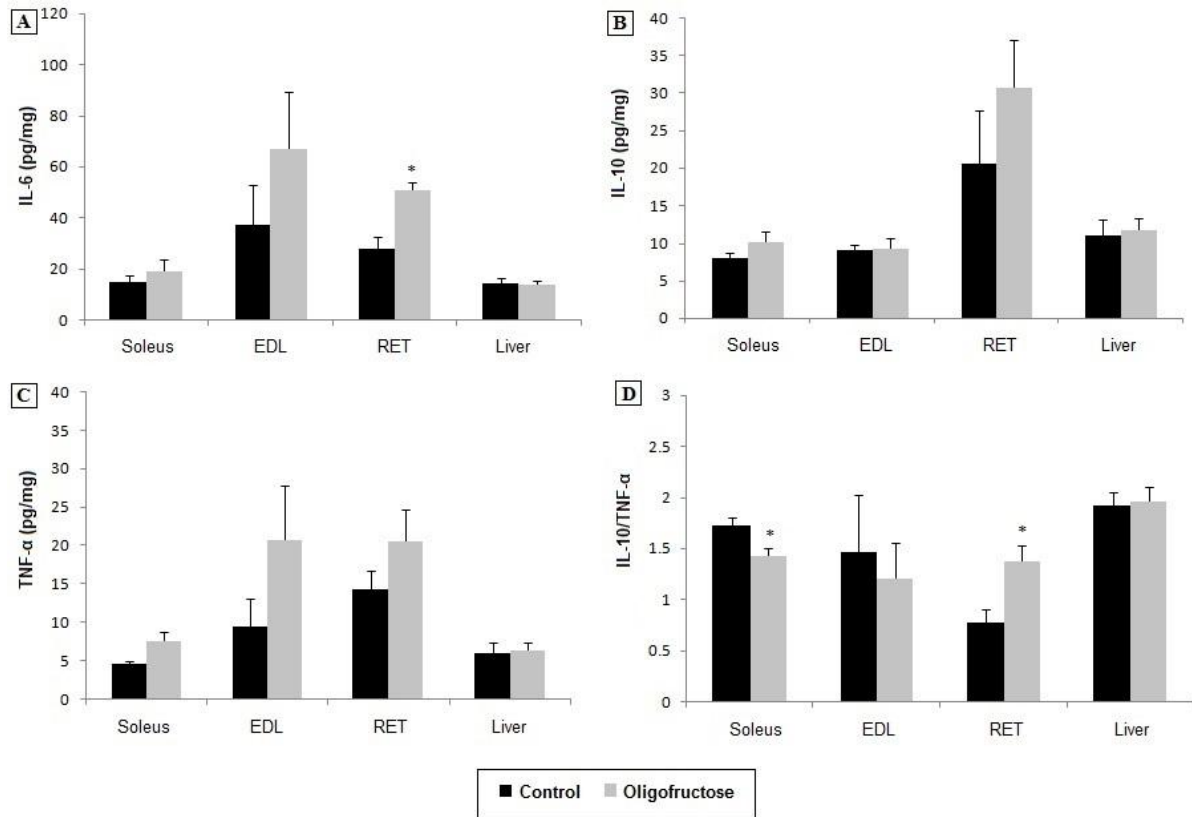


Figure 2. TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver. Data shown as mean $\pm$ SE. * p<0.05, versus C and ** p<0.01, versus C (n=8).

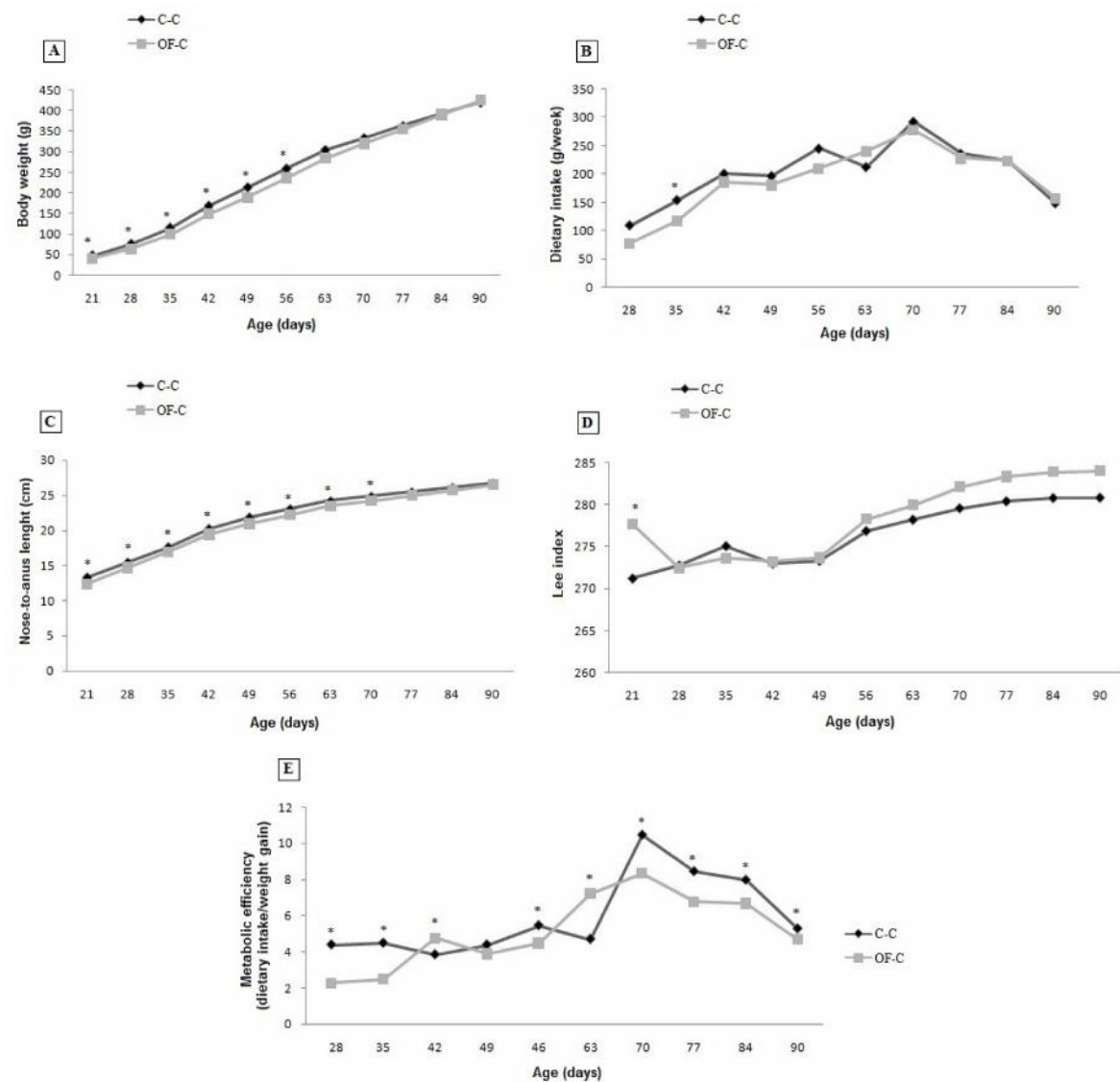


Figure 3. Body weight (A), dietary intake (B), nose-to-anus length (C), Lee index (D) and metabolic efficiency (E) of 90 days/old offspring. C-C (6) offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; OF-C (17) offspring of mothers fed diet supplemented with oligofructose fed control diet after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$, versus C-C.

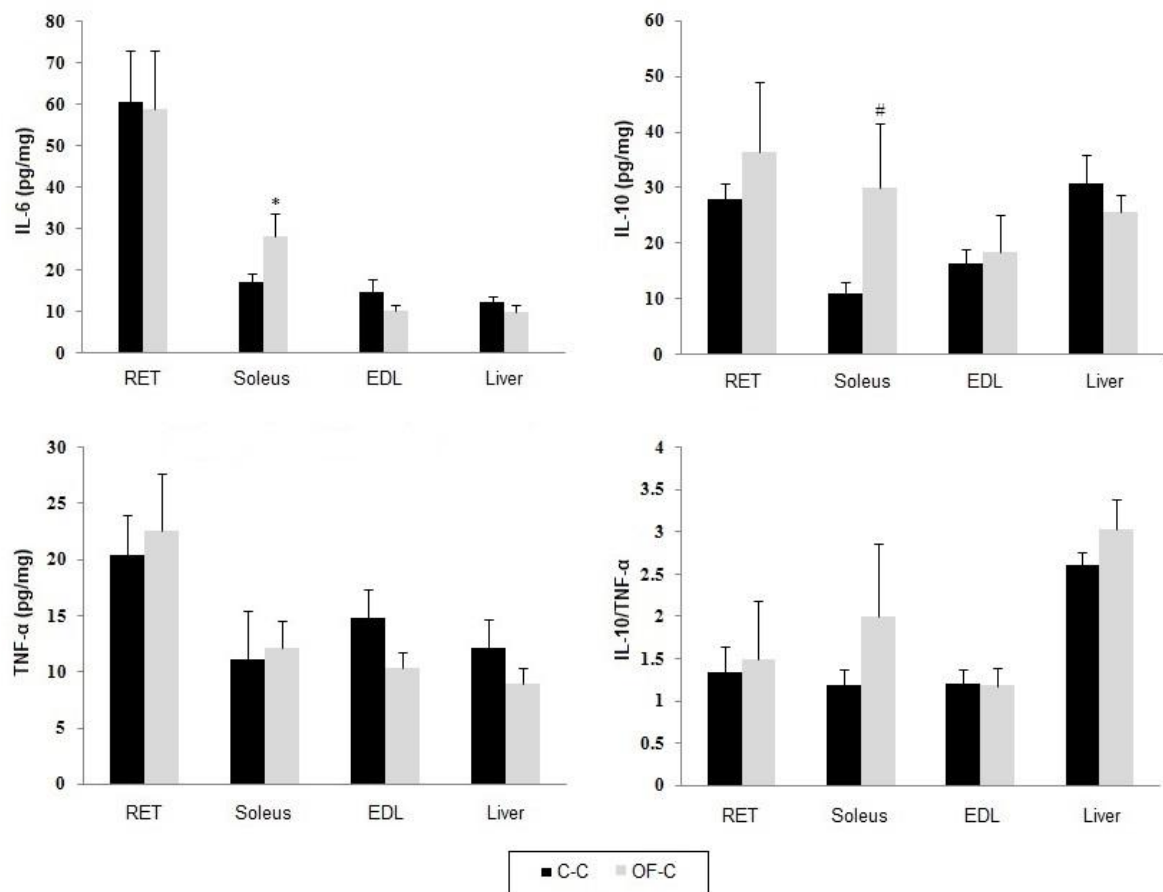


Figure 4. IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver. C-C (6) offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; OF-C (6) offspring of mothers fed diet supplemented with oligofructose fed control diet after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean $\pm$ SE. # $p=0.055$ and * $p<0.05$, versus C-C

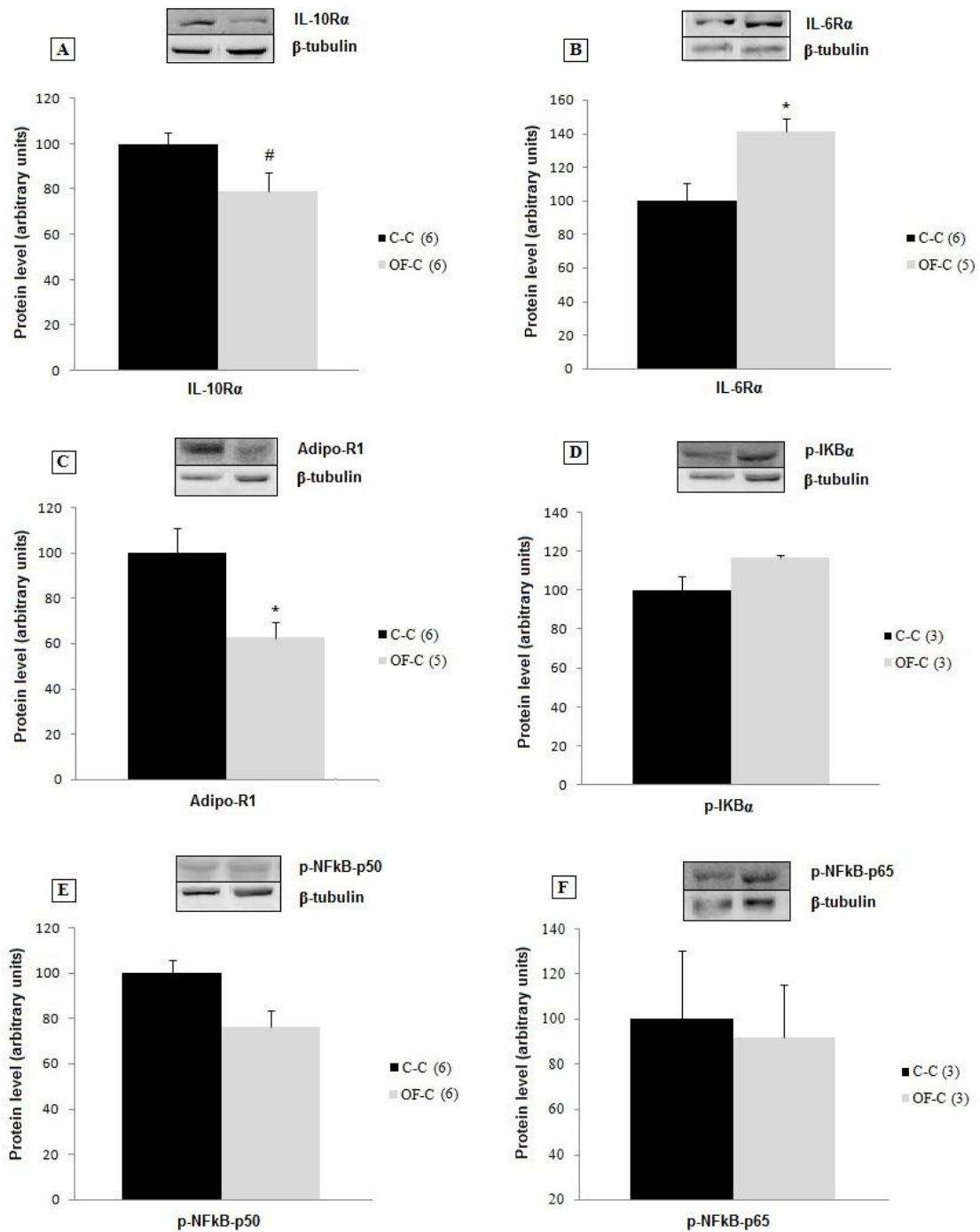


Figure 5. IL-10Rα (A), IL-6Rα (B), Adipo-R1 (C), p-IKBα (D), p-NFκB-p50 (E) and p-NFκB-p65 (F) protein expression in soleus muscle. C-C offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; OF-C offspring of mothers fed diet supplemented with oligofructose fed control diet after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean±SE. * $p<0.05$, versus C-C, # $p=0.065$, versus C-C.

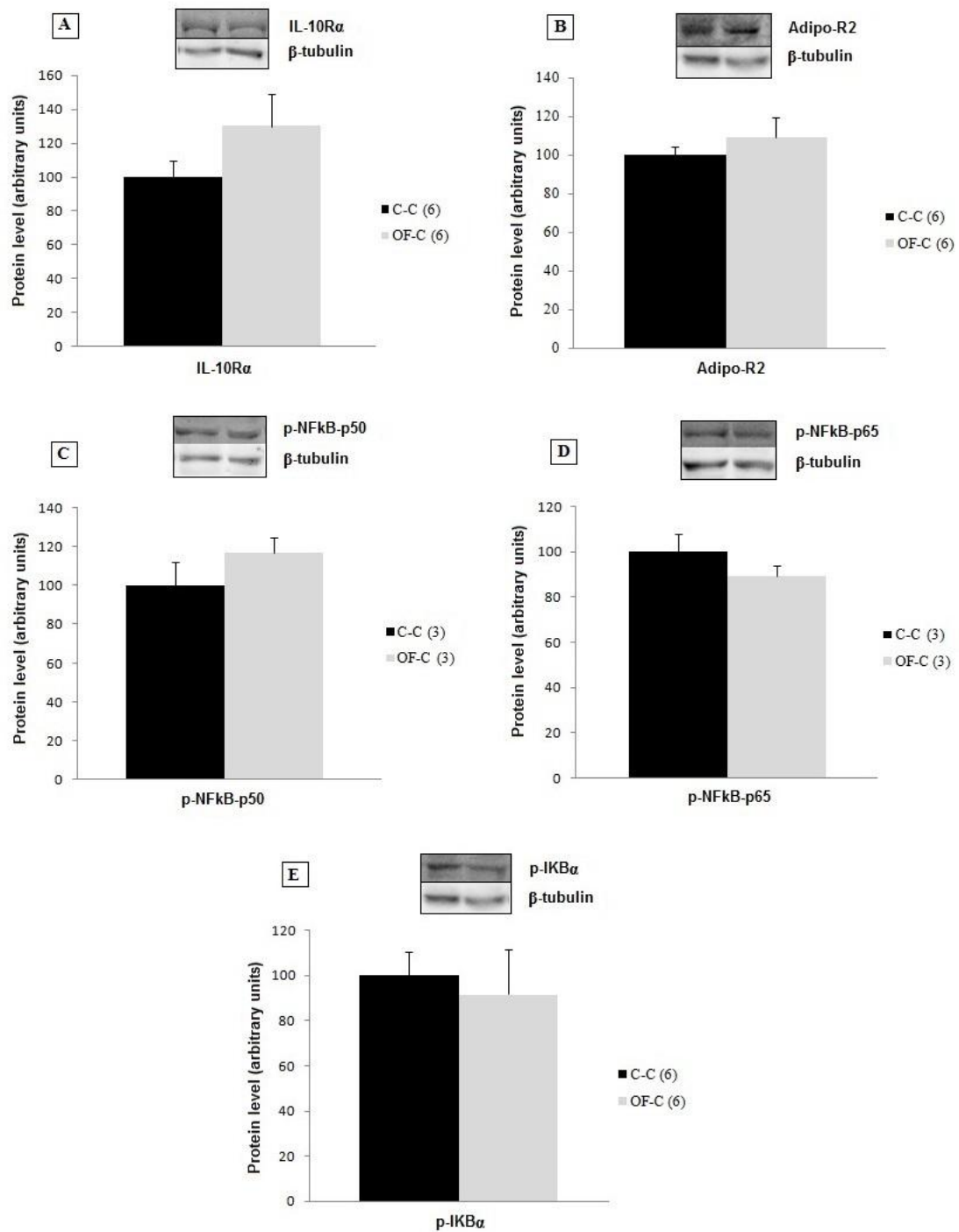


Figure 6. IL-10Rα (A), Adipo-R2 (B), p-NFκB-p50 (C), p-NFκB-p65(D) and p-IKBα (E) protein expression in liver. C-C offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; OF-C offspring of mothers fed diet supplemented with oligofructose fed control diet after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean±SE. * p<0.05, versus C-C.

Article 2

Title:

Effect of dietary intake of trans fatty acids during pregnancy and lactation on dams and offspring at 90 days-old, supplemented with oligofructose (10%), on metabolism and inflammatory parameters.

Abstract

Background. Previously, we showed that the intake of trans fatty acids (TFA) during pregnancy and lactation promotes a pro-inflammatory state in the offspring at twenty-one and ninety days old. Moreover, literature data indicates that the prebiotic intake may alter the intestinal environment and presenting antiinflammatory properties. The present study aims to evaluate the effect of a diet rich in TFA (7%) during pregnancy and lactation on metabolic parameters and inflammatory lactating rats and ninety days old offspring, concerning endotoxemia, metabolic and inflammatory parameters. In addition, to assess whether the diet supplemented with OF (10%) modify these parameters in ninety days old offspring of mothers who received diet containing TFA during pregnancy and lactation. **Methods.** On the first day of pregnancy, the rats were divided into two groups: control diet (C) and diet enriched with hydrogenated fat rich in TFA (T). The diets were maintained during pregnancy and lactation. In the twenty-first day of lactation animals were weaned and mothers euthanized. Part of the puppies were euthanized immediately and the others were kept in individual cages within ninety days of life, receiving a control diet or oligofructose (10%) supplemented diet. The blood, bowel, retroperitoneal adipose tissue (RET), parametrial fat mothers and epididymal of puppies, liver, soleus muscle tissues and EDL were collected. The serum was used for measuring lipopolysaccharide (LPS), free fatty acids (FFA), TNF- α , hormones, insulin, Ghrelin and adiponectin as well as cytokines by specific kits. The liver, and soleus and EDL RET muscle tissue were used for determination of cytokine content by specific kits. The liver and soleus muscle tissue were placed in a specific buffer to perform Western blotting. Genomic DNA Bacteria present in the colon feces was determined by real time PCR. **Results.** Maternal intake of TFA promoted increased Lee index and the protein expression of p-p65-NFkB in offspring with 90 days of life. Supplementation of offspring with oligofructose (10%) promoted reduction of Lee index and IL-6 and TNF- α content, accompanied by an increased protein expression of ADIPO-R2 in the liver and *Lactobacillus* spp. Genomic DNA in colon. **Conclusion.** Dietary intake of an oligofructose (10%) supplemented diet by offspring, reversed the obesogenic and pro-inflammatory effect exerted by maternal consumption of trans fatty acids during

pregnancy and lactation, thus reducing Lee index and IL-6 content and TNF- α , accompanied by an increased protein expression of ADIPO-R2 in the liver and *Lactobacillus* spp. Genomic DNA in colon. Together, these results indicate that supplementation with oligofructose (10%) can be an important tool for dietary prevention and control of metabolic disorders such as obesity.

INTRODUCTION

“Metabolic Programming” concept refers to the possible influence of maternal nutrition which can occur both in the fetus and in the newborn lasting for life, by adaptive responses of the fetus to specific environmental conditions, which may alter gene expression and permanently affect the structure and function of several organs and tissues, thereby inducing phenotypic changes.^(1,2) Poor maternal nutrition during this period can print permanent changes in the structure and key function of organs, predisposing the individual to metabolic disorders in adulthood, among them the development of obesity the.^(3,4)

In recent decades, several authors reported a positive correlation between the development of metabolic diseases and the production of proinflammatory cytokines.⁽⁵⁻⁸⁾ TFA intake can promote increased LDL-cholesterol oxidative stress and the production of inflammatory markers (IL-6, TNF- α and C-reactive protein), as well as a decrease in HDL-cholesterol.⁽⁹⁻¹¹⁾ Previously, our group found that maternal intake of hydrogenated vegetable fat, rich in trans and saturated fatty acids (TFAs), during pregnancy and lactation, promoted in offspring with 21 days of life an increasing of fat of the carcass; in serum triacylglycerol and cholesterol; gene expression of PAI-1 and TNF- α and protein expression of TRAF-6 in adipose tissue. The TFA treatment also led to a reduction in serum leptin and adiponectin; in adiponectin mRNA and protein expression ADIPO-R1 in adipose tissue.^(12,13) In the same experimental procedures, Pisani et al. (2008) detected in the offspring with 90 days of life elevation at gene expression of PAI-1 in adipose tissue and Pimentel et al. (2012) in serum endotoxin, IL-6, TNF- α and IL1- β ; the TLR4 protein expression, MyD88 and NF κ Bp65 in the hypothalamus and also a reduction of ADIPO-R1 (adiponectin receptor 1). These results showed that the maternal intake of hydrogenated vegetable fat during pregnancy and lactation cause a pro-inflammatory state that promotes deleterious metabolic effects similar to those observed in obesity.

Modifications in the proportion of intestinal bacteria with increased content of probiotic bacteria such as Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp, are related to improvement in glucose tolerance and inflammatory state.^(16,17) Many authors have found that supplementation of prebiotic fiber inulin-type, particularly oligofructose

promotes changes in intestinal bacterial composition plays an important role in controlling food intake, glucose metabolism and inflammation⁽¹⁸⁻²³⁾ and therefore can become a strategy for promoting protective effect against the development of obesity and other metabolic diseases.

LPS, also known as endotoxins, are found in the external cellular membranes of gram-negative intestinal bacteria, and when found increased intestinal permeability situations can be absorbed and may interact with cell TLR4 receptors, inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α .^(19,21,24)

In contrast, oligofructose (OF), fructooligosaccharides (FOS) and inulin, prebiotic fibers members of the inulin-type fructans group, are fermented by the colonic bacteria and can alter the intestinal environment.⁽²¹⁾ Prebiotic fibers, such as OF, appear to induce the production of short chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate), which have anti-inflammatory properties, alters intestinal permeability, thereby reducing LPS translocation to blood circulation.^(21,25-29) On the other hand, we previously showed that the maternal consumption of a control diet supplemented with OF (10%) during pregnancy and lactation is deleterious to offspring development, increases endotoxemia and promotes a pro-inflammatory effect in 21-d-old pups.^(30,31)

The aim of this study was to evaluate the effects of maternal intake of hydrogenated vegetable fat (7%), rich in TFA, during pregnancy and lactation, on metabolism and inflammatory parameters in lactating rats and ninety days offspring. In addition, evaluate if a control diet supplemented with OF (10%) modify these parameters in the offspring, ninety days of life of mothers who received diet containing TFA during pregnancy and lactation.

MATERIAL AND METHODS

Animals and treatments

The experimental research committee of the Universidade Federal de São Paulo approved all procedures for the care of the animals used in this study and followed international recognized guidelines (CEUA protocol n°737014). The rats were kept under controlled conditions of light (12-h light/12-h dark cycle with lights on at 07:00) and temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), with *ad libitum* water and food. Three-month-old female Wistar rats (4 animals in each group) were left overnight to mate, and copulation was verified the following morning by the presence of sperm in vaginal smears.

On the first day of pregnancy, the dams were isolated in individual cages and sequentially divided into two groups, each receiving: a control diet (C diet, Cgroup) and a diet enriched with hydrogenated vegetable fat (T diet, T group). On the day of delivery, considered day 0 of lactation, litters were adjusted to eight pups each. The diets were maintained throughout pregnancy and 21 days of lactation. After 21 days of lactation offspring were divided into three groups, C-C offspring of mothers fed a control diet that remained receiving control diet, T-C offspring of mothers fed with T diet and started receiving control diet, T-OF offspring of mothers who received T diet and started receiving diet supplemented with oligofructose (10%). The groups were kept until the offspring reach 90 days of age. The three diets were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN-93G)^(32,33) and were similar in calories and lipid content. The source of lipids for the C and OF diets was soybean oil, and the principal source for the T diet was partially hydrogenated vegetable fat, which is rich in TFAs. The OF diet was prepared by adding 100 g/kg diet of oligofructose (Orafti P95, Pemuco, Chile). According to manufacturer, the OF used in this study is a mixture of oligosaccharides extracted from chicory root. These oligosaccharides are composed of fructose units connected by β (2–1) links. Some of these molecules are terminated by a glucose unit. The degree of polymerization (DP) of oligofructosein on this supplement ranges between 2 and 8. The centesimal composition of the diets is presented in Table 1.

Experimental procedures

The dams after 21 days of lactation period and pups at 90th days of life were euthanized by decapitation. The animals were fasted fed for 10 hours. Trunk blood was collected and immediately centrifuged at 2500rpm for 15 minutes. The serum was separated and stored at -80°C for later determination of lipopolysaccharides (LPS), free fatty acids (FFA), ghrelin, adiponectin, leptin, insulin, glucose, triacylglycerol, total cholesterol and HDL-cholesterol. Carcasses of animals were eviscerated, heavy and kept at -20°C until analysis of fat and protein content. The total lipids were extracted as described by Stansbie et al. (1976) and quantified by gravimetric method.⁽³⁵⁾ The retroperitoneal white adipose tissue (RET), liver, EDL and soleus muscle were isolated, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Serum determination of lipopolysaccharides

Serum concentration of LPS was performed using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay, a quantitative chromogenic test for detecting endotoxin (LAL QCL-1000 assay, Lonza, USA). Serum samples were diluted 10 times with pyrogen-free water and incubated into pyrogen-free tubes at 75°C for 5 minutes. Previously, all materials used in the test were autoclaved to render them pyrogens-free and avoid interference in the test. The standard curve used in the assay was generated by known concentrations of LPS of the strain *Escherichia coli* O111:B4.

Biochemical and hormonal serum analysis

The serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations were measured with a commercial enzymatic colorimetric kit (Labtest, Brazil). The insulin and adiponectin concentrations were quantified using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Linco Research, USA). For determination of serum free fatty acids, the samples were diluted 20 times and was used 96-well Serum/Plasma Fatty Acid Kit Non-Esterified Fatty Acids 500 Point

Detection Kit (Zenbio, USA). The methodologies followed the recommendations of the manufacturer and are listed in the protocols accompanying the product.

Serum determination of TNF- α

The concentration of TNF- α in the serum was analyzed using the MILLIPLEX MAP 96-well Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit (Millipore, Billerica, MA, USA). All procedures required for this analysis were performed by the Instituto Genese de Análises Científicas (IgAc, São Paulo, Brazil). The manufacturer's recommendations, which are listed in the protocol accompanying the product, were followed for the analysis. The assay did not detect the concentrations of IL-6 and IL-10 (interleukin-10) cytokines; thus, only the TNF- α serum concentration was presented in the results.

Tissues cytokines content

Portions of the RET (0.3 g), liver (0.1 g), EDL and SOL (0.1 g) were homogenized in 800 μ L of chilled extraction buffer (100 mM Trizma Base pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 mM NaF; 10 mM Na₄P₂O₇; 10 mM Na₃VO₄; 2 mM PMSF; 0.1 mg/ml aprotinin). After homogenization, 80 μ L of 10% Triton X-100 was added to each sample. These samples were held on ice for 30 minutes and then centrifuged (20817 g, 40 minutes, 4°C). The supernatant was saved, and protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California) with bovine serum albumin as a reference. Quantitative assessment of TNF- α , IL-6 and IL-10 proteins was carried out using ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the recommendations of the manufacturer. All samples were run in duplicate, and the mean value is reported.

Genomic DNA extraction from fecal samples and real-time polymerase chain reaction (PCR-RT)

Genomic DNA from fecal samples of colon was extracted with QiagenQIAmp DNA Stool Minikit(Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration was quantified in the spectrophotometer NanoDropND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EUA) and reading was performed at wave lengths of 260, 280 and 230nm for obtaining the concentration of DNA/ μ L. The purity was estimated by 260/280nm ratio which must range between 1.8 and 2.0 for nucleic acids. All samples were maintained at -80°C.

Lactobacillus spp.was quantified by real-time polymerase chain reaction. Relative levels of lactobacillus spp. DNA was quantified in real time, using Syber Green primer in an ABI Prism7500 Sequence Detector (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative levels of the housekeeping gene *all bacteria* were measured. The primers used were: lactobacilluspp.5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'(sense)and 5'-CACCGCTACACATGGAG-3' (antisense) and all bacteria 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' (sense) and 5'-GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' (antisense). Results were obtained using Sequence Detector software (Applied Biosystems) and are expressed as a relative increase, using the method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ described by Livak&Schmittgen (2001).

Protein analysis by Western Blotting

After euthanasia, the soleus muscle (SOL) and liver were removed and placed in 800 μ L of extraction buffer prepared on the day of experiment (100 mM Trizma base pH 7.5, 20 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF-phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1 mg of aprotinin per mL). The tissues were rapidly homogenized using a polytron, and 800 μ L of 1% Triton X-100 was then added. After 30 minutes, the homogenate was centrifuged at 14000 rpm for 40 minutes at 4°C. The supernatant was maintained on ice, and the total protein content was determined by the Bradford method using the Bio-Rad reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin (BSA) as reference.

The samples were treated with Laemmli buffer (0.01% bromophenol blue, 100 mM sodium phosphate pH 7.0, 50% glycerol, 10% SDS) at a ratio of 4:1 containing

100 mM DTT (dithiothreitol). The proteins (50 µg) were boiled for 5 min before loading onto 10% SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membrane was performed for ~90 minutes/4 gels at 15 V (constant) in a Bio-Rad semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nonspecific protein binding to the nitrocellulose membrane was reduced by overnight pre-incubation at 22°C in blocking buffer composed of basal solution (100 mM Trizma base pH 7.5, 500 mM NaCl, Tween 20 0.02%) containing 1% BSA.

The nitrocellulose membranes were incubated overnight at 22°C with antibodies against NFκB p50 in the phosphorylated form (p-NFκB p50), IL-6Rα, IL-10Rα and ADIPOR1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and NFκB p65 in the phosphorylated form (p-NFκB p65), α-Tubulin and β-Tubulin (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA). Antibodies were diluted in 1:1000 (Santa Cruz) or 1:5000 (Cell Signaling) with blocking buffer and then washed for 30 min in basal solution. The blots were subsequently incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at 22°C. To evaluate protein loading, membranes were stripped and reblotted with an anti-β-tubulin antibody as appropriate. Specific bands were detected by chemiluminescence following ECL reagent addition (Amersham/ GE), and the visualization/capture was performed by exposure to Alliance 4.7 equipment (Uvitec, Cambridge, UK). Band intensities were determined by optical densitometry (Scion Image- Release Beta 3b, NIH, USA).

Statistical analysis

Statistical significances of the differences between the means of the two groups of dams samples were assessed using Student's *t* test, and the statistical significance of the differences among the means of the three pups groups was assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Turkey post hoc test. All statistical tests were performed using the Stats Direct. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Maternal weight gain and dietary intake

The body weight gain during pregnancy was similar between T and C groups during pregnancy and lactation period (Figure 1A and 1B). Although, the group that received trans diet (T) during pregnancy and lactation had a higher food intake, at first pregnancy week, compared with the control (C) group (Figure 1C).

Maternal relative tissue's weight, carcass fat and protein content

Weight of tissues, protein and fat carcass did not differ between T and C groups of dams (Table 2).

Maternal serum analyses and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels

Serum concentration of LPS was lower in T group of mother, but insulin, glucose, FFA, NPY, ghrelin, adiponectin, total and HDL cholesterol and triacylglycerol did not differ between the C and T groups after 21 days of lactation (Table 3).

Lactobacillus spp. genomic DNA levels on fecal colon content did not differ between T and C groups (Table 3).

Maternal tissue's cytokine content

The IL-6 content in RET and TNF- α in soleus muscle was higher in T group than in the C (Figure 2A and C), but IL-10 content and IL-10/TNF- α ratio did not differ among the groups in all studied tissues (Figure 2 B and D).

Offspring's weight gain and dietary intake

Pup's body weight at 21 days old was similar between C-C, T-C and T-OF groups. At 28 to 56 days old the body weight of T-OF group was lower than C-C, but similar to T-C. From 70 days old T-OF group showed lower body weight when compared to both groups, C-C and T-C (Figure 3).

Nose- to anus length was lower in T-C and T-OF group than C-C at 21 days old. At 28 to 63 days old the length of T-OF, but not T-C group, remains lower than C-C. From 70 days old to 84 the T-C and T-OF returned to lower length compared to C-C, but at 90 days old only T-C group remains lower than C-C (Figure 3).

Lee index was higher in T-C and T-OF groups at 21 days old, compared to C-C. From 63 to 90 days old T-C showed a higher Lee index when compared to both groups and T-OF was similar than C-C (Figure 3).

Offspring's relative tissue weight, carcass fat and protein content

The content of fat carcass, weight of RET and epididymal adipose tissues was lower in T-OF group when compared to C-C and T-C, but no differences were found in carcass protein content. Weight of liver, soleus and EDL muscle did not differ between groups (Table 4).

Offspring's serum analyses and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels

TNF- α serum concentration was lower in T-C and T-OF groups when compared to C-C. The ghrelin serum concentration was higher in T-OF than C-C and T-C groups. The leptin serum concentration was similar between C-C and T-C groups, but when compared T-C and T-OF group, the last one showed lower concentration of this hormone. T-C and T-OF treatments did not promote modifications in insulin, glucose, triacylglycerol, total and HDL cholesterol, but T-OF promoted a decrease in free fatty acid serum concentration in 90 days/old puppies (Table 5).

T-OF group showed a significant increase in *Lactobacillus* spp. content in colon when compared to C-C and T-C groups (Table 5). No differences were observed when compared C-C and T-C groups *Lactobacillus* spp. content (Table 5).

Offspring's tissue cytokine content

The IL-6 and TNF- α content in liver was higher in the T-OF than in the C-C and T-C groups (Figure 5A and 5C). The IL-10/TNF- α ratio was higher in T-OF group when compared to C-C, but not to T-C group (Figure 5D). In RET, soleus and EDL muscle the IL-6, IL-10, TNF- α content and IL-10/TNF- α ratio was similar between groups (Figure 5A, B, C and D).

Offspring's tissue protein expression

The protein expression of Adipo-R1 was decreased in soleus muscle of T-OF group when compared to C-C and T-C (Figure 6 C). No changes were observed in protein expression of IL-6R α , IL-10R α , p-NFkB-p50, p-NFkB-p65 and p-IKB α in soleus muscle (Figure 6A, B, D, E and F).

In the liver the protein expression of Adipo-R2 was higher in T-OF group when compared to C-C, but not to T-C group (Figure 7B). The p-NFkB-p50 protein expression was higher in T-C group when compared to C-C, but this protein expression in T-OF group was similar to C-C (Figure 7C). The IL-10R α , NFkB-p65 and p-IKB α protein expression in the liver was similar between all groups (Figure 7A, 7D and 7E).

DISCUSSION

The pro-inflammatory effect of trans fatty acid intake is well established, being harmful through a variety of mechanisms, such increasing production of inflammatory markers protein.^(9,10) In the present study, diet containing hydrogenated vegetable fat, rich in trans fatty acid, during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in dams with increased content of IL-6 in RET and TNF- α in soleus muscle (Figure 2). Evidence about the effects of trans fatty acids to pregnant and lactating women are scarce.

Surprisingly, the serum levels of LPS were lower in T group compared to C and not affect de *Lactobacillus* spp. content in colon. There were no differences between groups with respect to serum levels of insulin, glucose, free fatty acids, adiponectin, ghrelin, triacylglycerol, total cholesterol and HDL (Table 3). Despite this, is known that trans fatty acid consumption affects lipid metabolism, endothelial function, increases the risk of cardiovascular disease development and insulin resistance.^(9,10)

The T maternal diet did not affect the body weight at 21 or 90 days old offspring, but nose-to-anus length was lower in T-C group at 21 and from 70 to 90 days old (Figure 3). Previously, our group demonstrated that the 21-day-old pups from dams fed a diet rich in TFA (7%) during pregnancy and lactation presented showed a lower body weight, body weight gain and length at 21 days old.⁽³¹⁾ On the other hand, the results by Hachul et al. with the same experimental design showed no differences in body weight, body weight gain and length at birth and 21 days old offspring.⁽³⁰⁾

Some evidences show that oligofructose supplementation promotes weight loss.⁽³⁷⁻³⁹⁾ Hachul et al. (2013) had shown that supplementation of the dam's diet with 10% oligofructose during pregnancy and lactation reduced the offspring's body weight, body weight gain, length and lipid carcass content. In the present study, supplementation of offspring 10% oligofructose promotes a reduced body weight at 28 to 56 and 70 to 90 days old offspring of mothers that received a diet rich in trans fatty acid during pregnancy and lactation. The same group of offspring showed

reduced length from 21 to 84 days old, but at 90 days old this difference was not observed.

The Lee index is an indicator of obesity used for rats, equivalent to BMI for humans. Lee index was higher in T-C and T-OF groups at 21 days old, compared to C-C, but this difference remained only in T-C group from 63 to 90 days (Figure 3). These results indicate that oligofructose (10%) supplementation of offspring reverses the obesogenic effect exerted by maternal consumption of trans fatty acids during pregnancy and lactation. The supplementation with oligofructose also promoted reduction of carcass fat and weight of white adipose tissues (retroperitoneal and epididymal), without changing the carcass protein content (Table 4).

T-C and T-OF treatments did not promote modifications in insulin, glucose, triacylglycerol, total and HDL cholesterol, but T-OF promoted a decrease in free fatty acid serum concentration in 90 days/old puppies (Table 5). Adipose tissue, specially the visceral fat depots, participate in the regulation of FFAs release to systemic circulation and evidences indicated that weight loss by diet and exercise is associated with a reduced free fatty acid flux.^(40,41) In accordance, Menittiet al. (2014) observed a decrease in FFA serum concentration of the pups of mothers that received oligofructose supplementation (10%) or hydrogenated vegetable fat during pregnancy and lactation, followed by reduction in the body weight and RET-relative weight.

Increased leptin promotes an increase of α -MSH production, antagonizing the activity of NPY neurons and consequently reducing the intake to feed.⁽⁴⁵⁾ In this sense, the acylating of ghrelin to the active form has also been shown to decrease in response to prebiotic supplementation in rats^(37,42-44), since ghrelin is an orexigenic gastrointestinal hormone.⁽⁴⁶⁾ Therefore, supplementation with these fibers reduces the dietary energy content by reducing the dietary intake. In the present study, the fasting ghrelin serum concentration was higher in T-OF than C-C- and T-C groups, and serum leptin was lower in the same group when compared to T-C, and that it may be part of a compensation mechanism associated with reduced visceral and carcass fat content promoted by oligofructose intake by offspring.

Pisani et al. (2008) showed that the maternal intake of hydrogenated vegetable fat (7%) rich in TFA during pregnancy and lactation increases mRNA to TNF- α and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a proinflammatory adipokine with prothrombotic properties, in the pup's RET, and decreased serum adiponectin level. In accordance, Hachulet et al. (2013) observed that the consumption of TFA (7%) during pregnancy and lactation increased the TNF- α content in RET and decreased the adiponectin serum concentration of the 21-day-old offspring. The same group observed an increase in mRNA levels of PAI-1, in the epididymal adipose tissue of 90-day-old offspring from dams fed a diet of TFA during pregnancy and lactation. Together, these studies suggested a likely association between early TFA exposure and increased risk for developing cardiovascular diseases in adulthood.⁽¹⁴⁾

In accordance, the present study showed that maternal dietary intake rich in trans fatty acid promoted a pro-inflammatory effect in 90 days old offspring, by increasing protein expression of phosphorylated form of nuclear factor kappa B p50 subunit in the liver (Figure 7 C). Likewise, Pimentel et al. (2012) showed that the intake of TFA from hydrogenated vegetable fat (7%) during pregnancy and lactation increased serum endotoxin levels; NF- κ B p65 subunit (p65), TLR4 and MyD88 protein expression; and hypothalamic concentrations of IL-6, TNF- α and IL-1 β , accompanied by a decrease in AdipoR1 hypothalamic protein expression, which may contribute to the hypothalamus inflammation of 90-day-old pups. Controversially, in the present study, TNF- α serum concentration was lower in T-C and T-OF groups when compared to C-C.

On the other hand, oligofructose supplementation promotes in ninety days old offspring a reduction in IL-6 and TNF- α content in liver (Figure 5 A and C), an increasing in IL-10/TNF- α ratio (Figure 5 D) and Adipo-R2 protein expression (Figure 7 B). The maternal dietary intake of TFA promotes an increasing in protein expression of phosphorylated form of nuclear factor kappa B p50 subunit in offspring that fed a control diet, but this was not observed in the group that received oligofructose supplementation (T-OF). These results suggest that, despite the reduction of protein expression of Adipo-R1 in Soleus muscle (Figure 6 C), the ingestion of diet supplementation of oligofructose, by offspring, reversed the

proinflammatory effects caused by maternal consumption of trans fatty acids in the offspring liver. This may be related to the reduction of visceral fat and the increase of *Lactobacillus* spp. content in colon offspring supplemented with oligofructose after weaning (Table 5).

Recently, *Lactobacillus* spp., belonging to the phylum Firmicutes, has been associated with some beneficial effects, such as less weight gain during pregnancy in obese women and their levels correlated with lower birth weight of their children⁽⁴⁸⁾; promotes lowers size of the adipocytes and fat cells in mice fed a diet rich in fat⁽⁴⁹⁾; reduction of fat mass and BMI in obese diabetic patients, and improves insulin sensitivity.⁽⁵⁰⁾

Despite this evidence, the results about the effects of *Lactobacillus* spp. in control body weight still controversial. Some *Lactobacillus* species has been associated with obesity and weight gain while others are associated with weight loss.⁽⁵¹⁾ Arora et al. (2014), found that *Lactobacillus plantarum* promoted reduction of the inflammatory and endotoxemia state in rats. In accordance, Peña and Versalovic (2003) reported anti-inflammatory effects by a reduction of TNF- α production, with *Lactobacillus rhamnosus* treatment in macrophages. Drissi et al. (2014) examined a 13 complete genomes belonging to seven different *Lactobacillus* spp. previously associated with weight gain or weight protection. According to the authors, the main species related to the protective effects was *L. plantarum* and *L. gasseri*, by a mechanism involving participation in the degradation of fructose and promotion the synthesis of dextrin, L-rhamnose and acetate, that had a prevent effect to obesity development in animals.^(51,53,54)

CONCLUSION

Dietary intake of hydrogenated vegetable fat, rich in trans fatty acid, during pregnancy and lactation promoted a pro-inflammatory effect in dams with increased content of IL-6 in RET and TNF- α in soleus muscle and in ninety days old offspring, by increasing proteic expression of phosphorylated form of nuclear factor kappa B p50 subunit in the liver. In addition, maternal consumption of TFA during pregnancy and lactation, promoted an obesogenic effect on offspring at 90 days of life, evidenced by the increase in the Lee index when compared to other groups. On the other hand, oligofructose (10%) supplementation of offspring reverse the obesogenic and inflammatory effect exerted by maternal consumption of trans fatty acids during pregnancy and lactation, by reducing Lee Index, IL-6 and TNF- α content, promoting a higher protein expression of Adipo-R2 in liver and *Lactobacillus* spp. Genomic DNA in colon. Together, these results indicate that supplementation with oligofructose promotes beneficial effects in minimizing pro-inflammatory and obesogenic effects generated by maternal TFA dietary intake.

REFERENCES

1. Barker DJP (1998) In utero programming of chronic disease. *ClinSci (Lond)* **95**, 115- 128.
2. Godfrey KM, Barker DJ (2001) Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* **4**, 611-24.
3. Barker DJ (1997) Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull* **53**, 96-108.
4. Innis SM (2007) Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev* **83**, 761-6.
5. Waterland RA, Garza C (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal Clinical Nutrition*, **69**, 179-197.
6. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):939-49.
7. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316**, 129-39.
8. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine New* **17**, 4-12.
9. Remig V, Franklin B, Margolis S (2010) Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation. *J Am Diet Assoc* **110**, 585–92.
10. Micha R, Mozaffarian D (2008) Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**, 147–52.
11. Gebauer SK, Psota TL, Kris-Etherton PM (2007) The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids* **42**, 787–799.

12. Pisani LP, Oyama LM, Bueno AA et al. (2008) Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. *Nutrition* **24**, 255-61.
13. Oliveira JL, Oyama LM, Hachul AC et al. (2011) Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation caused increase in TRAF-6 and reduced AdipoR1 in white adipose tissue, but not in muscle of 21 days old offspring rats. *Lipids Health Dis* **25**, 10:22.
14. Pisani LP, Oller do Nascimento CM, Bueno AA et al. (2008) Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. *Lipids Health Dis* **4**, 7-13.
15. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC et al. (2012) Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. *J Nutr Biochem* **23**, 265–271.
16. Cani PD, Delzenne NM, Amar J et al. (2008) Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol* **56**, 305-9.
17. Tilg H, Moschen AR, Kaser A (2009) Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*, **136**, 1476-83.
18. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F et al. (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374-2383.
19. Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761-1772.
20. Paul HA, Bomhof MR, Vogel HJ et al. (2016) Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. *Scientific Reports*, 6, 20683. <http://doi.org/10.1038/srep20683>

21. Nakamura YK & Omaye ST (2012) Metabolic diseases and pro- and prebiotics: Mechanistic insights. *Nutrition & Metabolism* **9**, 60. <http://doi.org/10.1186/1743-7075-9-60>
22. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L et al. (1999) Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* **129**, 113- 116.
23. Cummings JH, Macfarlane GT (2002) Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* **87**, Suppl 2, S145-S151.
24. Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**, 317–337.
25. Macfarlane GT, Macfarlane S (2011) Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol* **45**, Suppl, S120–127.
26. Damaskos D, Kolios G (2008) Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *Br J ClinPharmacol* **65**, 453–467.
27. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI (2012) Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15**, 474–479.
28. Kelly G (2008) Inulin-type prebiotics - a review: part 1. *Altern Med Rev* **13**, 315–329.
29. Roberfroid MB, Delzenne NM (1998) Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* **18**, 117–143.
30. Hachul AC, Mennitti LV, de Oliveira JL et al. (2013) Oligofructose supplementation (10%) during pregnancy and lactation does not change the inflammatory effect of concurrent trans fatty acid ingestion on 21-day-old offspring. *Lipids Health Dis* **1**, 12-59.

31. Mennitti LV, Oyama LM, de Oliveira JL et al. (2014) Oligofructose supplementation during pregnancy and lactation impairs offspring development and alters the intestinal properties of 21-d-old pups. *Lipids Health Dis* **5**, 13-26.
32. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-51.
33. Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* **127**, Suppl 5, S838-S841.
34. Stansbie D, Denton RM, Bridges BJ et al. (1976) Regulation of pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase activity in rat epididymal fat-pads. Effects of starvation, alloxan-diabetes and high-fat diet. *Biochem J*. **154**, 225-36.
35. Oller do Nascimento CM, Williamson DH (1986) Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. *Biochem J* **239**, 233-236.
36. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta DeltaC(T))} Method. *Methods* **25**, 402–408.
37. Parnell, JA & Reimer, RA (2009) Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* **89**, 1751–9.
38. Parnell JA, Reimer RA (2010) Effect of prebiotic fiber supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: a dose-response study in JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* **103**, 1577-84.
39. Parnell JA, Reimer RA (2012) Prebiotic fibers dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* **107**, 601-13.

40. Shadid S, Jensen MD (2006) Pioglitazone increases non-esterified fatty acid clearance in upper body obesity. *Diabetologia* **49**, 149–157.
41. Jensen MD (2008) Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, Suppl 1, S57–S63.
42. Yang J, Brown MS, Liang G et al. (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**, 387-96.
43. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM (2004) Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr* **92**, 521–6.
44. Cani PD, NeyrinckAM, Maton N (2005) Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res* **13**, 1000-7.
45. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG et al. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289-95.
46. Zigman JM, Bouret SG, Andrews ZB (2016) Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. *Trends Endocrinol Metab* **27**, 54-63.
47. Pisani LP, Oyama LM, Bueno AA et al. (2008) Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. *Nutrition* **24**, 255-61.
48. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L et al. (2010) Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr* **104**, 83-92.
49. Aronsson L, Huang Y, Parini P et al. (2010) Decreased fat storage by lactobacillus paracasei is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS ONE*. Published online: 30 September 2010. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013087>.
50. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T et al. (2010) Effects of Lactobacillus acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* **104**, 1831-8.

51. Drissi F, Merhej V, Angelakis E et al. (2014) Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutrition & Diabetes*. Published online: 24 February 2014. doi: <http://doi.org/10.1038/nutd.2014.6>
52. Arora S, Kaur IP, Chopra K et al. (2014) Efficiency of double layered microencapsulated probiotic to modulate proinflammatory molecular markers for the management of alcoholic liver disease. *Mediators of Inflammation*. Published online: 22 may 2014. doi: <http://doi.org/10.1155/2014/715130>.
53. Wakabayashi S, Hashii Y (1994) Food and sugar preparation containing indigestible dextrin. Japanese Patent EP0582518 A2, Matsutani Chemical Industries Co. Ltd.
54. Yamashita H, Fujisawa K, Ito E et al. (2007) Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1236–1243.

Table 1. Composition of the control diet, control diet supplemented with oligofructose and diet enriched with trans fatty acids according to AIN-93.

Diet (g/100g)			
Ingredient	C	OF	T
Casein*	20.0	20.0	20
L-cystine†	0.3	0.3	0.3
Cornstarch†	62.0	52.0	62
Soybean oil‡	8.0	8.0	1.0
Vegetable	--	--	7.0
Butylhydroquinone†	0.0014	0.0014	0.0014
Mineral mixture§	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture#	1.0	1.0	1.0
Cellulose†	5.0	5.0	-
Choline bitartrate†	0.25	0.25	5.0
Oligofructose£	-	10.0	0.25

*Casein was obtained from Labsynth, São Paulo, Brazil.

†L-cystine, cornstarch, butylhydroquinone, cellulose and choline bitartrate were obtained from Viafarma, São Paulo, Brazil.

‡Oil was supplied from soybean (Lisa/Ind. Brazil).

§Mineral mix 9mg/kg diet): calcium, 5000; phosphorus, 1561; potassium, 3600;sodium, 1019; chloride, 1571; sulfur, 300; magnesium, 507; iron, 35; copper,6.0; manganese, 10.0; zinc, 30.0; chromium, 1.0; iodine 0.2; selenium, 0.15;fluoride, 1.00; boron, 0.50; molybdenum, 0.15; silicon, 5.0; nickel, 0.5; lithium,0.1; vanadium, 0.1 (AIN-93G, mineral mix, Rhostr, Brazil).

#Vitamin mix (mg/kg diet): thiamin HCL, 6.0, riboflavin, 6.0; pyridoxine HCL 7.0;niacin, 30.0; calcium pantothenate, 16.0; folic acid, 2.0; biotin, 0.2; vitamin B12,25.0; vitamin A palmitate 4000 IU; vitamin E acetate, 75; vitamin D3, 1000 IU; vitamin KI, 0.75. (AIN-93G, vitamin mix, Rhostr, Brazil).

£Oligofructose (P95) was manufactured by Orafiti (Pemuco, Chile) and was obtained by Viafarma, São Paulo, Brazil.

Table 2. Body composition and tissues weight of the dams

	Control	Trans
Carcass protein (g/100g)	16.77 ± 0.89	17.42 ± 0.56
Carcass fat (g/100g)	9.15 ± 0.32	8.65 ± 1.29
Retroperitoneal adipose tissue relative weight (g/100g)	0.83 ± 0.06	0.81 ± 0.09
Liver relative weight (g/100g)	3.51 ± 0.40	3.23 ± 0.35
EDL muscle relative weight (g/100g)	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Soleus muscle relative weight (g/100g)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Parametrial adipose tissue relative weight (g/100g)	1.24 ± 0.09	1.24 ± 0.09

Data shown as mean±SE. * p<0.05 ** p=0.05, versus Control. (n=10)

Table 3. Serum LPS, adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol, cholesterol/HDL ratio in the dams and *Lactobacillus* spp. genomic DNA levels on fecal content in colon

	Control	Trans
LPS ([EU]/mL)	13.06 ± 1.96	8.19 ± 1.14 *
NPY (ng/mL)	1.603 ± 0.11	1.536 ± 0.10
Ghrelin (ng/mL)	2.70 ± 0.34	2.0 ± 0.35
Adiponectin (pg/mL)	48.44 ± 10.26	41,33 ± 10,37
Insulin (µg/mL)	0.62 ± 0.05	0.67 ± 0.16
Glucose (mg/dL)	93,55 ± 3,56	93.76 ± 1.29
FFA (µM)	2509 ± 240.6	2748 ± 201.54
Triacylglycerol (mg/dL)	98.10 ± 2.54	94.08 ± 1.42
Total Cholesterol	84.85 ± 3.50	91.94 ± 7.65
HDL-Cholesterol (mg/dL)	43.47 ± 3.81	46.85 ± 2.72
Cholesterol total/HDL Ratio	2.01 ± 0.10	1.94 ± 0.09
<i>Lactobacillus</i> spp. genomic DNA levels	1.40 ± 0.58	2.36 ± 1.02

Serum results are showed as mean±SE (n=10). Results of *Lactobacillus* spp. are expressed in arbitrary units, stipulating 100 as the control value (n=5). * p<0.05, versus C.

Table 4. Body composition and tissues weight in the offspring at ninety days old

	C-C	T-C	T-OF
Carcass fat (g/100g)	14.23 ± 0.51 ^a	14.08 ± 0.55 ^a	13.02 ± 0.15 ^b
Carcass protein (g/100g)	9.75 ± 1.22 ^a	9.89 ± 1.13 ^a	9.8 ± 1.17 ^a
Retroperitoneal adipose tissue relative weight (g/100g)	2.16 ± 0.14 ^a	2.05 ± 0.12 ^a	1.49 ± 0.07 ^b
Liver relative weight (g/100g)	3.11 ± 0.12 ^a	3.24 ± 0.08 ^a	3.11 ± 0.11 ^a
EDL muscle relative weight (g/100g)	0.08 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a
Soleus muscle relative weight (g/100g)	0.09 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^a
Epididymal adipose tissue relative weight (g/100g)	2.04 ± 0.28 ^{ab}	2.37 ± 0.14 ^a	1.47 ± 0.14 ^b
Data shown as mean±SE. ^{ab} p<0.05 (n = 5)			

Table 5. Serum LPS, TNF- α , adiponectin, insulin, glucose, FFA, triacylglycerols, total cholesterol, HDL cholesterol in the offspring at ninety days old

	C-C (10)	T-C (6)	T-OF (6)
LPS ([EU]/mL)	4.99 $\pm$ 1.10 ^a	9.45 $\pm$ 2.41 ^a	7.51 $\pm$ 3.0 ^a
TNF- α	11.06 $\pm$ 1.02 ^a	3.08 $\pm$ 0.70 ^b	6.93 $\pm$ 1.05 ^b
Ghrelin (ng/mL)	0.70 $\pm$ 0.09 ^a	0.59 $\pm$ 0.06 ^a	1.95 $\pm$ 0.34 ^b
Leptin (pg/mL)	9.38 $\pm$ 2.08 ^{ab}	10.96 $\pm$ 1.88 ^a	5.36 $\pm$ 0.83 ^b
Insulin (μ g/mL)	1.29 $\pm$ 0.18 ^a	1.35 $\pm$ 0.15 ^a	0.89 $\pm$ 0.13 ^a
Glucose (mg/dL)	94,23 $\pm$ 3,31 ^a	98,33 $\pm$ 0,98 ^a	95.56 $\pm$ 0.99 ^a
FFA (μ M)	2501.14 $\pm$ 232.56 ^{ab}	3164 $\pm$ 317.1 ^a	1926.5 $\pm$ 0.99 ^b
Triacylglycerol (mg/dL)	111,21 $\pm$ 2,10 ^a	109,67 $\pm$ 9,70 ^a	106.67 $\pm$ 14.68 ^a
Total Cholesterol	147.8 $\pm$ 1.28 ^a	152.88 $\pm$ 3.86 ^a	152.0 $\pm$ 10.32 ^a
HDL-Cholesterol (mg/dL)	47.44 $\pm$ 0.2 ^a	47.55 $\pm$ 0.2 ^a	47.29 $\pm$ 0.15 ^a
Cholesterol total/HDL Ratio (mg/dL)	3.16 $\pm$ 0.03 ^a	3.19 $\pm$ 0.07 ^a	3.22 $\pm$ 0.05 ^a
<i>Lactobacillus</i> spp. genomic DNA levels	100 $\pm$ 63.43 ^a	87.67 $\pm$ 26.02 ^a	3572.19 $\pm$ 1562.02 ^b

Data shown as mean $\pm$ SE. ^{ab} p<0.05

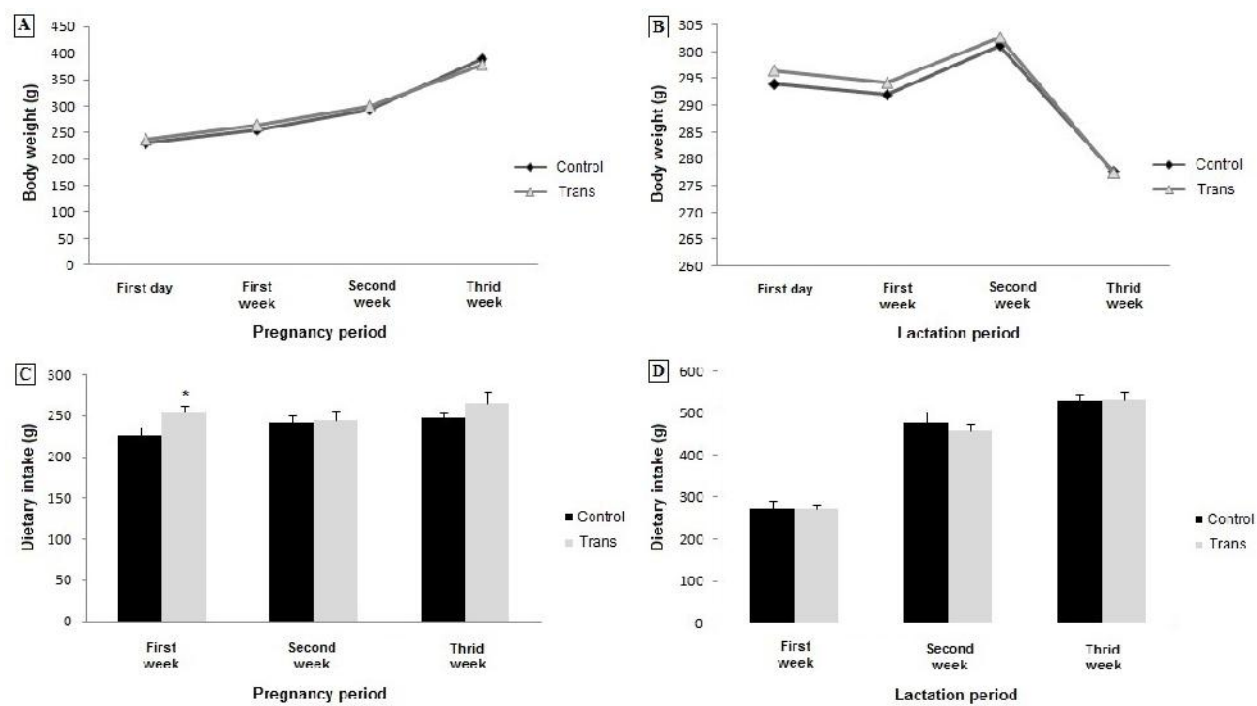


Figure 1. Body weight gain and dietary intake during pregnancy (A, C) and lactation period (B, D). Data shown as mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$, versus C and (n=10)

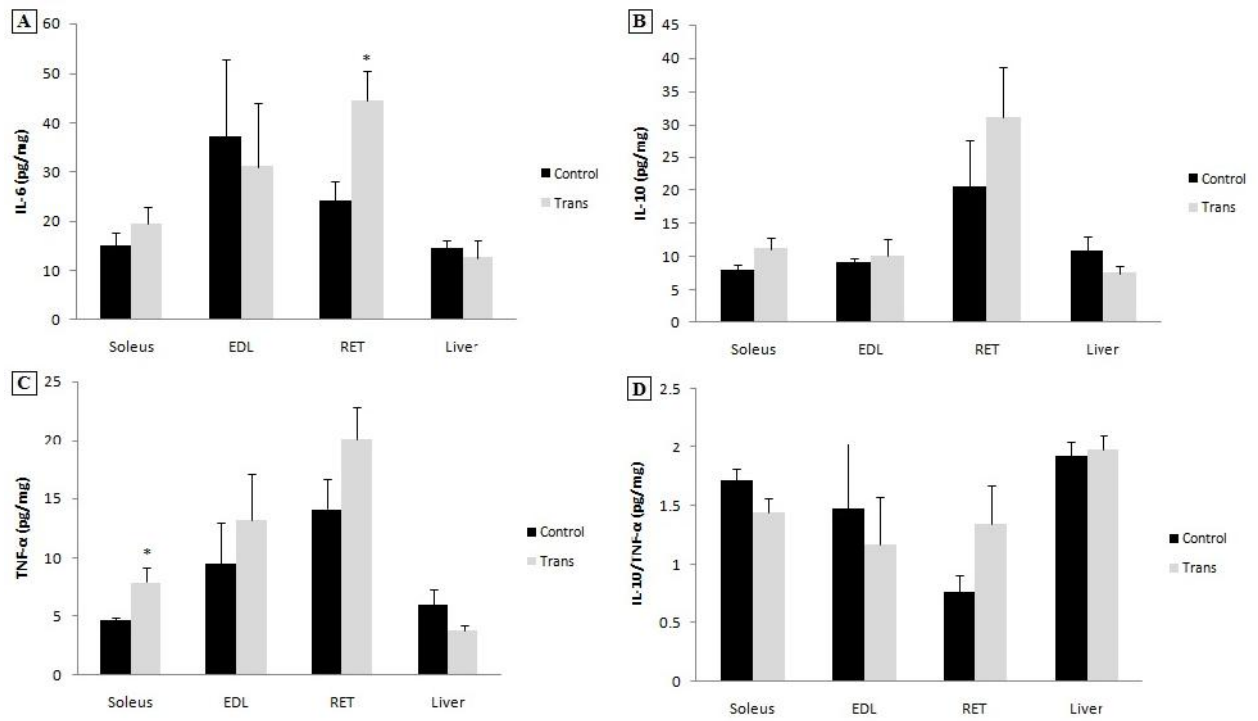


Figure 2. TNF-α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver of dams. Data shown as mean±SE (n=8). * p<0.05, versus C.

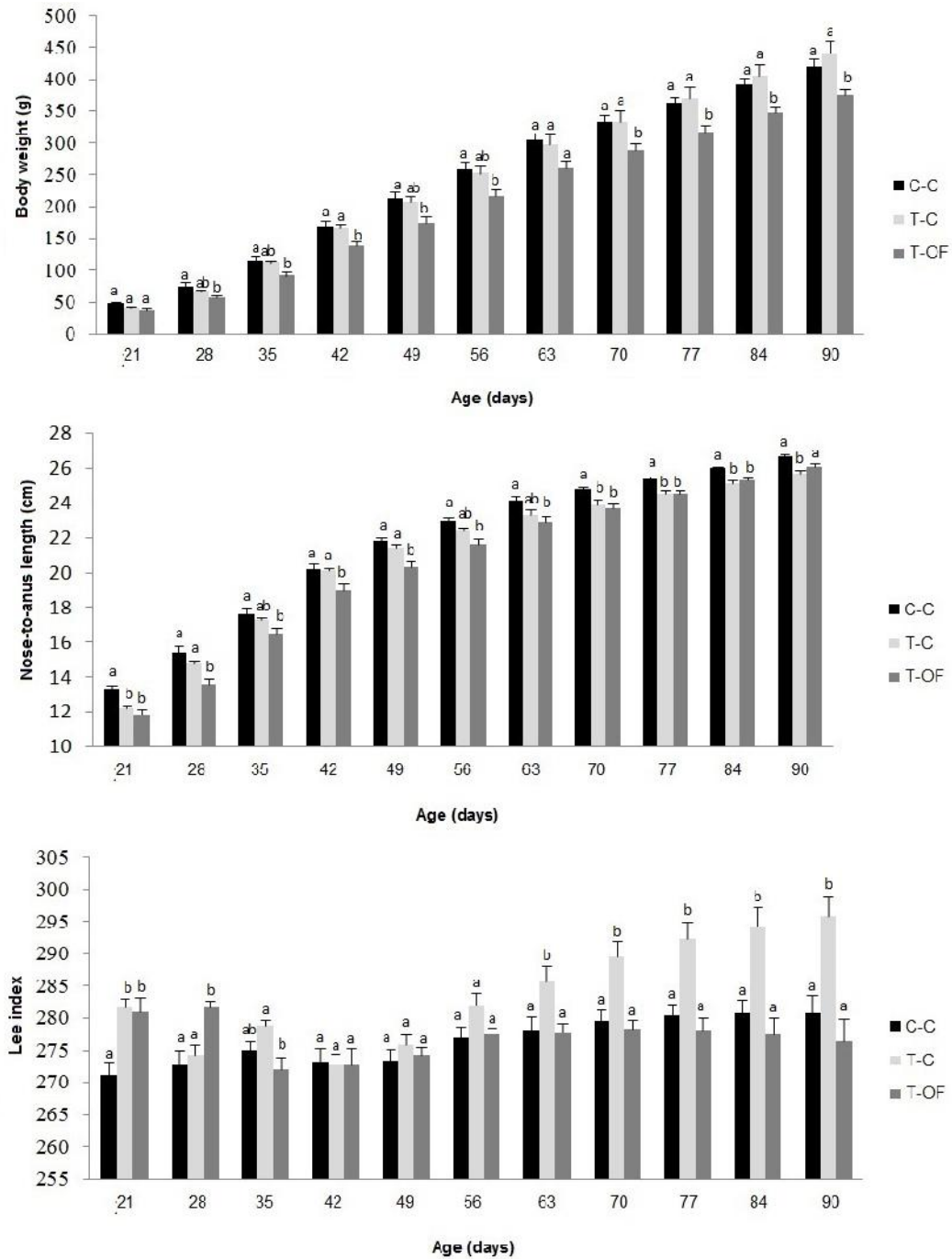


Figure 3. Body weight, nose-to-anus length and Lee index of 90 days-old offspring. C-C (6) offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; T-C (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed control diet after weaning; T-OF (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed diet supplemented with oligofructose after weaning. Data shown as mean±SE. $p < 0.05$.

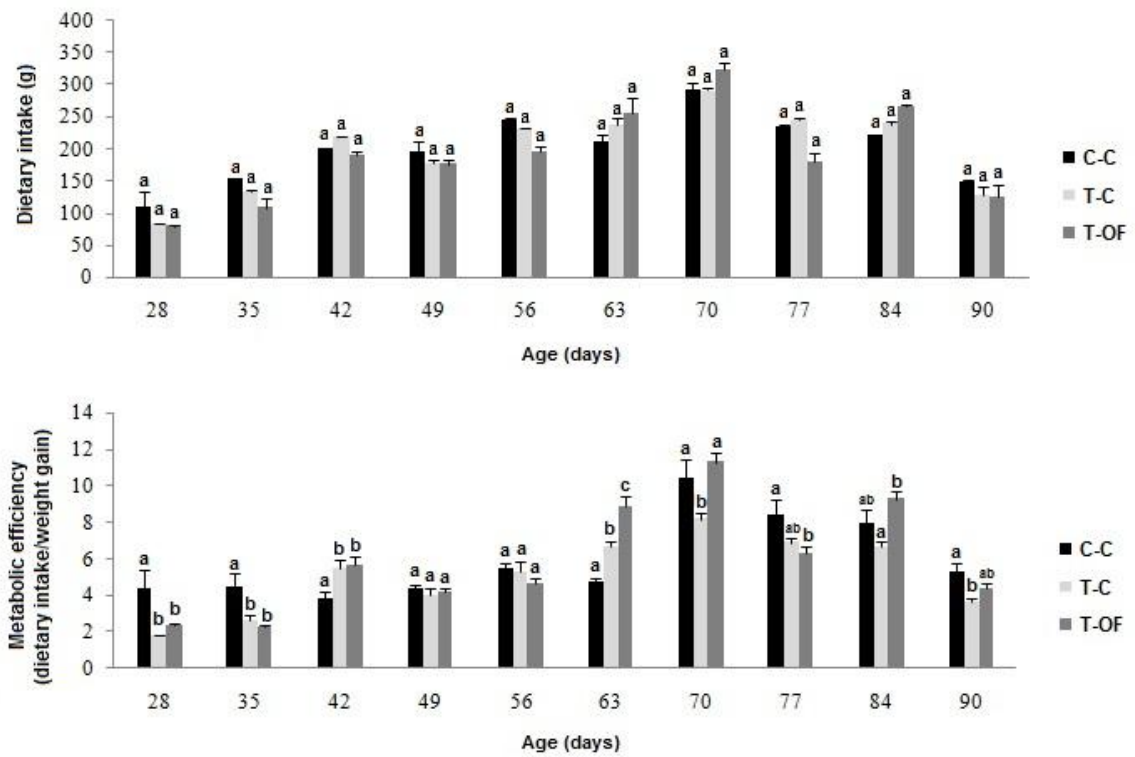


Figure 4. Dietary intake and metabolic efficiency of 90 days-old offspring. C-C (6) offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; T-C (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed control diet after weaning; T-OF (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed diet supplemented with oligofructose after weaning. Data shown as mean $\pm$ SE. $p < 0.05$.

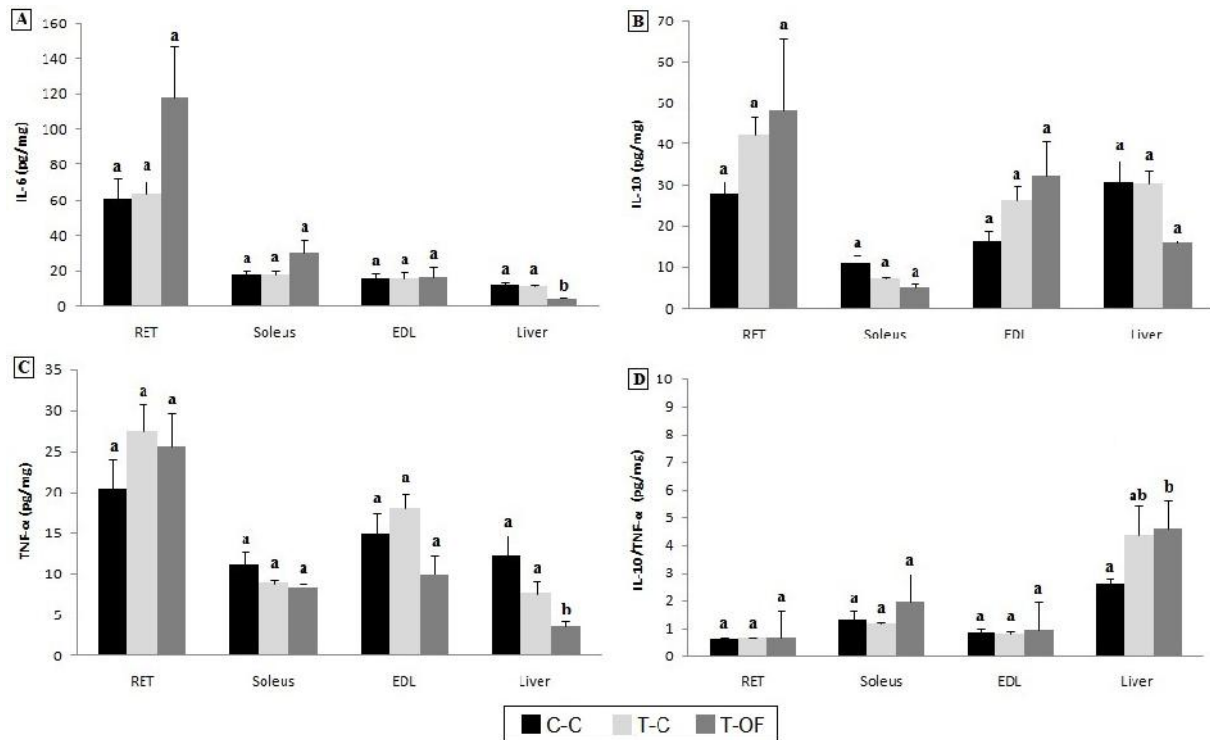


Figure 5. IL-6 (A), IL-10 (B), TNF-α (C) content and IL-10/ TNF- α ratio (D) in soleus, EDL, retroperitoneal adipose tissue (RET) and liver. C-C (6) offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; T-C (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed control diet after weaning; T-OF (6) offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed diet supplemented with oligofructose after weaning. Data shown as mean±SE. p<0.05.

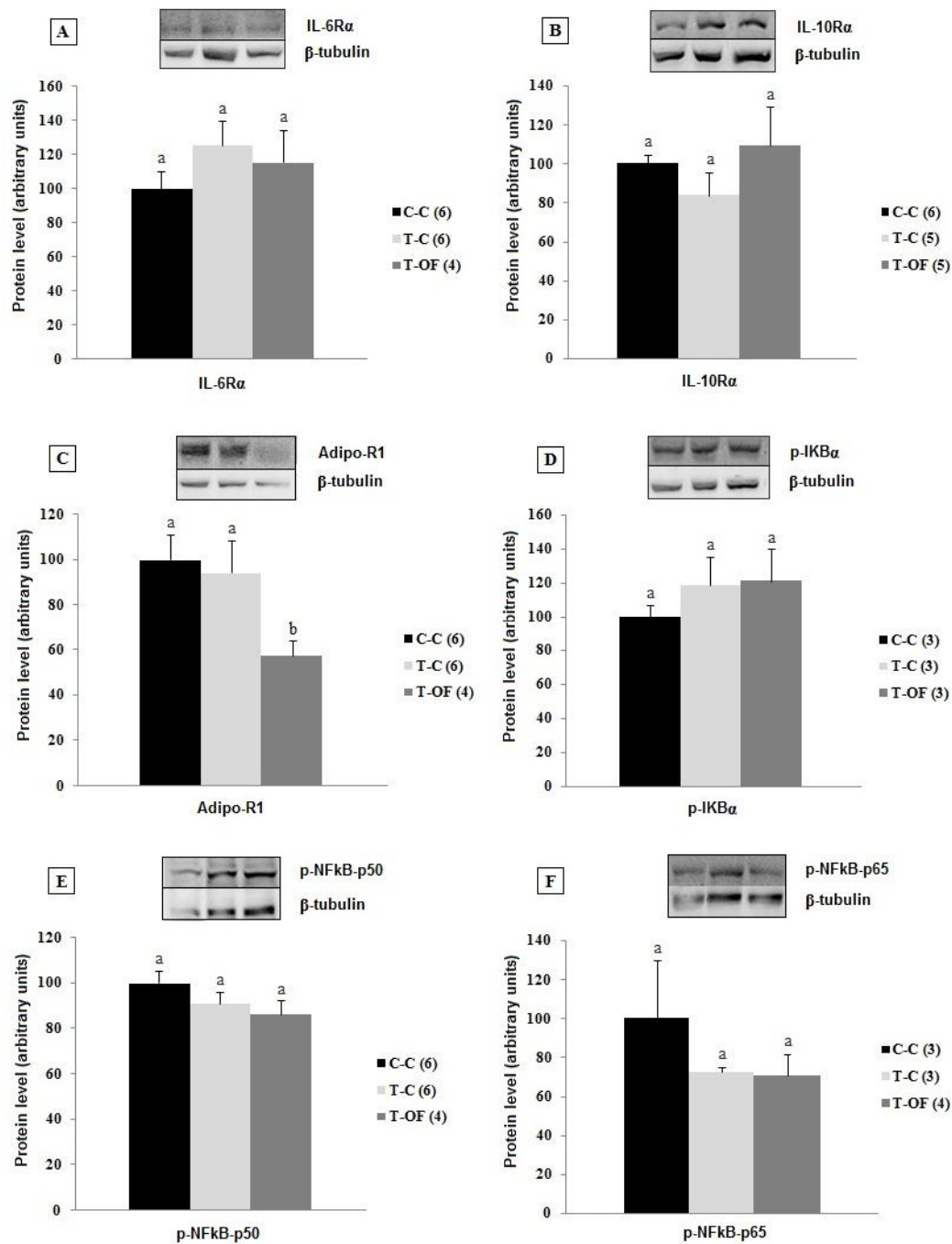


Figure 6. IL-6R α (A), IL-10R α (B), Adipo-R1 (C), p-IKB α (D), p-NF κ B-p50 (E) and p-NF κ B-p65(F) protein expression in soleus muscle. C-C offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; T-C offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed control diet after weaning; T-OF offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed diet supplemented with oligofructose after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean $\pm$ SE. $p < 0.05$.

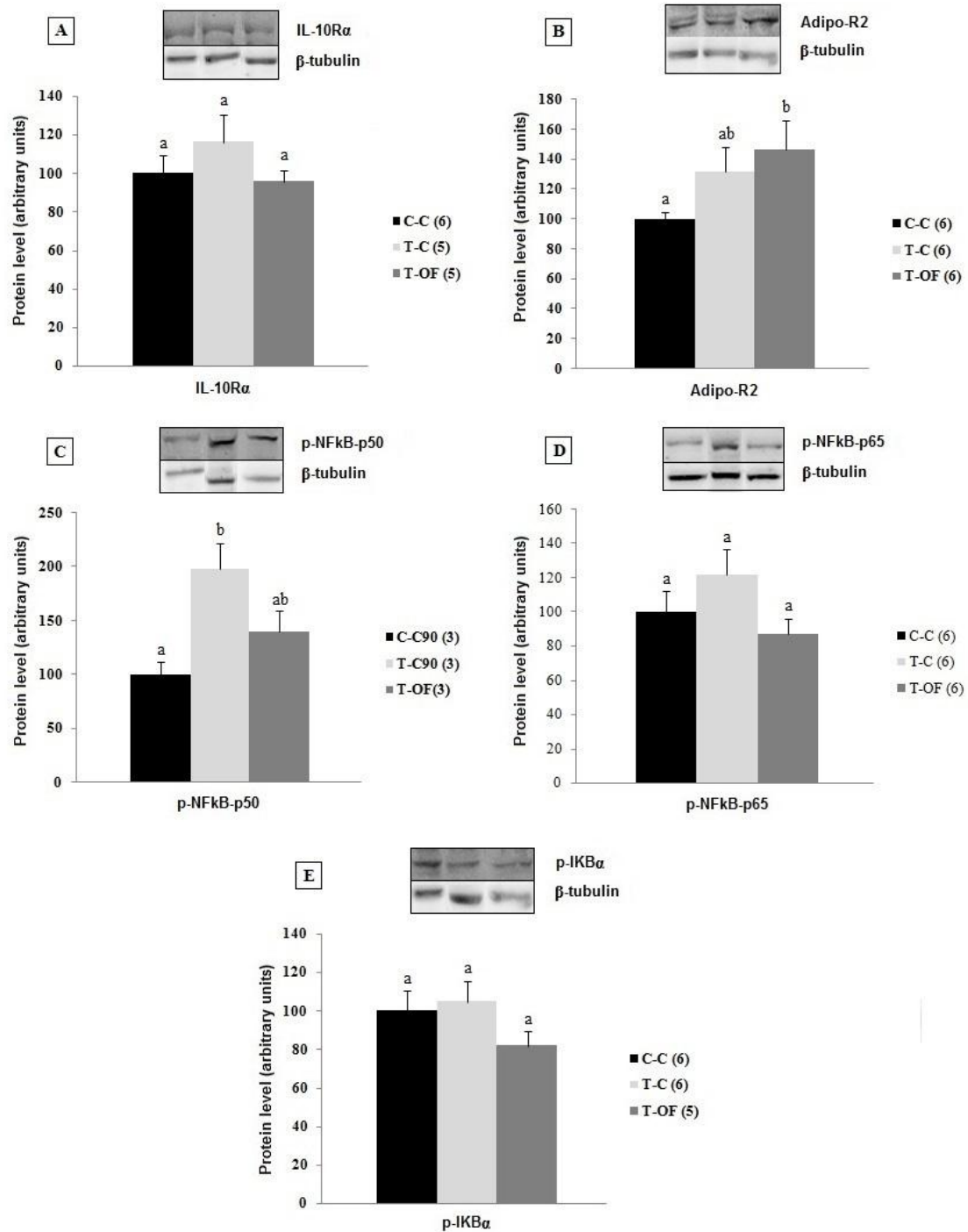


Figure 7. IL-10Rα (A), Adipo-R2 (B), p-NFκB-p50 (C), p-NFκB-p65 (D) and p-IKBα (E) protein expression in liver. C-C offspring of mothers fed with control diet fed control diet from weaning; T-C offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed control diet after weaning; T-OF offspring of mothers fed diet rich in trans fat acid fed diet supplemented with oligofructose after weaning. The number in brackets refers to the sample size. Data shown as mean±SE. $p < 0.05$.

6 SUMÁRIO DE CONCLUSÕES

6.1 O tratamento com dieta OF nas mães, promoveu:

- redução da ingestão alimentar e ganho de peso corporal durante a gestação e lactação.
- redução da massa do tecido adiposo RET e conteúdo de gordura da carcaça.
- redução dos níveis séricos de adiponectina, aumento de grelina, colesterol total e HDL.
- aumento do conteúdo de IL-6 no tecido adiposo RET, menor razão IL-10/TNF- α no tecido muscular sóleo e aumento dessa razão no tecido adiposo RET.
- nenhuma alterações nos níveis de lactobacillus spp. no cólon.

6.2 O tratamento com dieta OF materna na prole aos noventa dias de vida, causou:

- redução do peso corporal na prole até os cinquenta e seis dias de vida, além de redução do comprimento naso-anal até o septuagésimo dia. Aos noventa dias de vida não houve diferenças nesses parâmetros.
- nenhuma alterações no conteúdo de gordura da carcaça e tecidos adiposos na prole com noventa dias de vida.
- redução dos níveis séricos de TNF- α , NPY e aumento de grelina em jejum na prole de noventa dias de vida.
- aumento do conteúdo de IL-6 no tecido muscular sóleo na prole com noventa dias de vida.
- aumento da expressão protéica de IL-6R α e redução de Adipo-R1 no tecido muscular sóleo.
- nenhuma alterações nos níveis de lactobacillus spp. no cólon.

6.3 O tratamento com dieta T nas mães, promoveu:

- nenhuma alteração na ingestão alimentar, ganho de peso, conteúdo de lipídios e proteína da carcaça e também não promoveu modificações no peso dos tecidos coletados;
- redução da concentração sérica de LPS, porém sem alterações os demais parâmetros bioquímicos analisados;
- aumento do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo e IL-6 no tecido adiposo RET. Não alterou o conteúdo de citocinas no fígado e músculo EDL, bem como a razão IL-10/TNF- α .
- Não alterações nos níveis de *Lactobacillus* spp. no cólon.

6.4 A dieta materna TFA na prole aos noventa dias de vida, desencadeou:

- Nenhuma alteração no ganho de peso e no conteúdo de lipídios da carcaça. Não promoveu aumento dos depósitos de tecido adiposo, porém alterou o conteúdo de proteína da carcaça;
- Nenhuma alteração na ingestão alimentar, porém promoveu aumento a eficiência alimentar dos 21 aos 35 dias de vida, bem como aos 70 e noventa dias de vida.
- redução do comprimento naso-anal da prole aos 21 e aos noventa dias de vida.
- aumento do índice de Lee aos vinte e um dias de vida e dos 63 aos noventa dias de vida.
- redução dos níveis de TNF- α na prole de noventa dias de vida, porém não promoveu alterações nos demais parâmetros bioquímicos analisados;
- nenhuma alterações nos níveis de *Lactobacillus* spp. no cólon.
- aumento da expressão protéica da forma fosforilada de NFkB-p65.

6.5 O tratamento com dieta OF dos vinte e um aos noventa dias de vida, na prole de mães alimentadas com dieta rica em TFA durante a gestação e lactação, causou:

- nenhuma modificação no peso da prole de vinte e um dias de vida, porém reduziu o peso corporal dos 28 aos noventa dias de vida;
- redução do conteúdo de lipídios da carcaça, da massa do tecido adiposo epididimal, porém sem modificar o conteúdo de proteína da carcaça;
- nenhuma alteração na ingestão alimentar, porém promoveu aumento a eficiência alimentar dos 21 aos 35 dias de vida.
- redução do comprimento naso-anal da prole dos 21 e aos 84 dias de vida, porém o mesmo não foi observado aos noventa dias de vida.
- aumento do índice de Lee aos vinte e um dias de vida, o mesmo não foi observado dos 28 aos noventa dias de vida.
- redução dos níveis de TNF- α e grelina na prole de noventa dias de vida, porém não promoveu alterações nos demais parâmetros bioquímicos analisados;
- aumento dos níveis de Lactobacillus spp. no cólon.
- redução do conteúdo de TNF- α e IL-6 e aumento da razão IL-10/TNF- α no fígado.
- redução da expressão protéica de Adipo-R1 no tecido muscular sóleo, aumento da expressão protéica de Adipo-R2 no fígado.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com 10% de oligofrutose durante a gestação e lactação promoveu um efeito pró-inflamatório nas mães e prole com noventa dias de vida, associados à diminuição adiponectina sérica materna, aumento do conteúdo de IL-6 e da expressão protéica de IL-6R, bem como a redução da expressão protéica de Adipo-R1 no músculo sóleo da prole com noventa dias de vida. Por outro lado, a suplementação da prole com oligofrutose (10%) reverteu o efeito obesogênico e pró-inflamatório exercido pelo consumo materno de ácidos graxos trans durante a gravidez e lactação, reduzindo Índice de Lee e o conteúdo de IL-6 e TNF- α , acompanhado de uma maior expressão protéica de Adipo-R2 em fígado e DNA genômico de *Lactobacillus* spp. no cólon. Juntos, estes resultados indicam que a suplementação com oligofrutose (10%) promove efeitos distintos em fases diferentes da vida. Mais estudos deverão ser conduzidos no sentido de investigar o efeito dose-resposta da suplementação de oligofrutose durante a gestação e lactação sobre o desenvolvimento, metabolismo, endotoxemia e mecanismos inflamatórios em gestantes e seus filhos.

8 REFERÊNCIAS

1. Remig V, Franklin B, Margolis S, Kostas G, Nece T, Street JC. Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation. *J Am Diet Assoc* 2010;110(4):585–92.
2. Micha R, Mozaffarian D. Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79(3–5):147–52.
3. Gebauer SK, Psota TL, Kris-Etherton PM. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids* 2007;42(9):787–99.
4. Reik, W.; Dean, W.; Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001, 293, 1089–1093.
5. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 2001 Apr;4(2B):611-24.
6. Smith, Z.D.; Meissner, A. DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 2013, 14, 204–220.
7. Barker DJP: In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998, 95(2):115- 128.
8. Godfrey KM: Maternal regulation of fetal development and health in adult life. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998, 78(2):141-150.
9. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995;311(6998):171-4.
10. Barker DJ. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull.* 1997;53(1):96-108.
11. Innis SM. Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev.* 83(12):761-6, 2007.

12. Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S9-19.
13. Pisani LP, Oller do Nascimento CM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, Oyama LM. Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. *Lipids Health Dis*. 2008 Apr 4;7:13.
14. Oliveira JL, Oyama LM, Hachul AC, Biz C, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM, Pisani LP. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation caused increase in TRAF-6 and reduced AdipoR1 in white adipose tissue, but not in muscle of 21 days old offspring rats. *Lipids Health Dis*. 2011 Jan 25;10:22.
15. Pisani LP, Oyama LM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. *Nutrition*. 2008 Mar;24(3):255-61.
16. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oliveira JL, Losinskas-Hachul AC, Souza GI, das Graças T do Carmo M, Santos RV, de Mello MT, Tufik S, Seelaender M, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, Watanabe RH, Ribeiro EB, Pisani LP: Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. *J Nutr Biochem* 2012, 23(3):265–271. 44.
17. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal Clinical Nutrition* 1999; 69: 179-197.
18. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):939-49.
19. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Fève B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Mar;17(1):4-12.
20. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 25;316(2):129-39.

21. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070-5. Epub 2005 Jul 20.
22. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, Martín-Lagos JA, Anjos T, Martí-Romero M, Lopez RM, Florido J, Campoy C, Sanz Y. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr*. 2010 Jul;104(1):83-92.
23. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Jul;56(5):305-9.
24. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1476-83.
25. Aronsson L, Huang Y, Parini P, Korach-André M, Håkansson J, Gustafsson JÅ, Pettersson S, Arulampalam V, Rafter J. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS One*. 2010 Sep 30;5(9).
26. Andreassen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, Jakobsen M, Pedersen BK. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr*. 2010 Dec;104(12):1831-8.
27. Heijboer AC, Pijl H, Van den Hoek AM, Havekes LM, Romijn JA, Corssmit EP. Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2006 Dec;18(12):883-94.
28. Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav*. 2007 Sep 10;92(1-2):256-62. Epub 2007 May 21.
29. Kirchner H, Tong J, Tschöp MH, Pfluger PT. Ghrelin and PYY in the regulation of energy balance and metabolism: lessons from mouse mutants. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 May;298(5):E909-19.

30. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007;50:2374-2383.
31. Hachul AC, Mennitti LV, de Oliveira JL, Moreno MF, Okuda MH, Dos Santos B, Oyama LM, Ribeiro EB, do Nascimento CM, Pisani LP. Oligofructose supplementation (10%) during pregnancy and lactation does not change the inflammatory effect of concurrent trans fatty acid ingestion on 21-day-old offspring. *Lipids Health Dis*. 2013 May 1;12:59.
32. Mennitti LV, Oyama LM, de Oliveira JL, Hachul AC, Santamarina AB, de Santana AA, Okuda MH, Ribeiro EB, do Nascimento CM, Pisani LP. oligofructose supplementation during pregnancy and lactation impairs offspring development and alters the intestinal properties of 21-d-old pups. *Lipids Health Dis*. 2014 Feb 5;13:26.
33. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-1772.
34. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourié B, Bornet F, Rambaud JC: Short-chain fructo-oligosaccharide administration dosedependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 1999, 129(1):113- 116.
35. Cummings JH, Macfarlane GT: Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002, 87 Suppl 2:S145-S151.
36. Nakamura YK, Omaye ST: Metabolic diseases and pro- and prebiotics: mechanistic insights. *Nutr Metab (Lond)* 2012, 9(1):60.
37. Paul HA, Bomhof MR, Vogel HJ, Reimer RA. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. *Sci Rep*. 2016 Feb 12;6:20683.
38. Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child*. 1994 Oct;71(4):288-90.

39. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):349-53.
40. Morley R, Dwyer T. Fetal origins of adult disease? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Nov;28(11):962-6.
41. Gillman MW. Epidemiological challenges in studying the fetal origins of adult chronic disease. *Int J Epidemiol*. 2002; 31:294-299.
42. Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol*. 1999 Feb 1;514 (Pt 3):617-27.
43. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):571-633.
44. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992 Jul;35(7):595-601.
45. Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108 Suppl 3:545-53.
46. Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ. Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. *BMJ*. 1999 Jul 24;319(7204):245-9.
47. Smith CJ, Ryckman KK. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015 Jun 29;8:295-302.
48. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES, Milner J, Koh WP, Xie L, Zucker M, Buckley M, Cosgrove L, Lockett T, Fung KY, Head R. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(2):69-89.
49. Sales NM, Pelegrini PB, Goersch MC. Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. *J Nutr Metab*. 2014;2014:202759.

50. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J*. 1998 Aug;12(11):949-5.
51. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8Suppl):2393S-2400S.
52. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*. 2005 Jun;135(6):1382-6.
53. Semenkovich CF. Fatty acid metabolism and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Feb;14(2):72-6.
54. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr*. 2007 Jun;97(6):1064-73. Epub 2007 Apr 12.
55. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, Pisani LP. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem*. 2015 Feb;26(2):99-111.
56. Herrera E, Amusquivar E, López-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006;65(Suppl. 3):59–64.
57. Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 2005;26 (Suppl. A):S70–5.
58. Duttaroy AK. Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res* 2009;48(1):52–61.

59. Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK. Preferential uptake of long chain polyunsaturated fatty acids by isolated human placental membranes. *Mol Cell Biochem* 1996;155(1):77–83.
60. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008;27(5):685–93.
61. Albuquerque KT, Sardinha FL, Telles MM, Watanabe RL, Nascimento CM, Tavares do Carmo MG, et al. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. *Nutrition* 2006;22(7–8):820–9.
62. Daud AZ, Mohd-Esa N, Azlan A, Chan YM. The trans fatty acid content in human milk and its association with maternal diet among lactating mothers in Malaysia. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013;22(3):431–42.
63. Nishimura RY, Barbieri P, Castro GS, Jordão Jr AA, Perdoná Gda S, Sartorelli DS. Dietary polyunsaturated fatty acid intake during late pregnancy affects fatty acid composition of mature breast milk. *Nutrition* 2014;30(6):685–9.
64. Anderson NK, Beerman KA, McGuire MA, Dasgupta N, Griinari JM, Williams J, McGuire MK. Dietary fat type influences total milk fat content in lean women. *J Nutr*. 2005 Mar;135(3):416–21.
65. Innis SM. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. *Atheroscler Suppl* 2006;7(2):17–20.
66. Ibrahim A, Natrajan S, Ghafoorunissa R. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism*. 2005 Feb;54(2):240–6.
67. Innis SM, King DJ. trans Fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-cis n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. *Am J Clin Nutr* 1999;70(3):383–90.

68. Ibrahim A; Ghafoorunissa, Basak S, Ehtesham NZ. Impact of maternal dietary fatty acid composition on glucose and lipid metabolism in male rat offspring aged 105 d. *Br J Nutr.* 2009 Jul;102(2):233-41.
69. Duque-Guimarães DE, de Castro J, Martinez-Botas J, Sardinha FL, Ramos MP, Herrera E, et al. Early and prolonged intake of partially hydrogenated fat alters the expression of genes in rat adipose tissue. *Nutrition* 2009;25(7–8):782–9.
70. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60(3):329-39.
71. Friedrichs WE, Navarajo-Ashbaugh AL, Bowman BH, Yang F. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 209: 250-256.
72. Nascimento CO, Hunter L, Trayhurn P. Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313(3):702-8.
73. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
74. Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM. [Obesity and inflammation]. *Rev Med Univ Navarra.* 2004 Apr-Jun;48(2):49-54.
75. Rydén M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 21;318(1):168-75.
76. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50230-6.

77. Seki T, Miyasu T, Noguchi T, Hamasaki A, Sasaki R, Ozawa Y, Okukita K, Declerck PJ, Ariga T. Reciprocal regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in the differentiation of murine preadipocyte line 3T3-L1 and the hormonal regulation of fibrinolytic factors in the mature adipocytes. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):72-8.
78. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med.* 1996 Aug;28(4):371-80.
79. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes.* 2000 Aug;49(8):1374-80.
80. Prins JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002 Dec;16(4):639-51.
81. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1288-95.
82. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999 Dec 21-28;100(25):2473-6.
83. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001 Feb 27;103(8):1057-63.

84. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103(2):137-42.
85. Forsythe LK, Wallace JM, Livingstone MB. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev*. 2008 Dec;21(2):117-33.
86. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1595-9.
87. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):1930-5.
88. Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett*. 2005 Dec 19;579(30):6821-6.
89. Radin MS, Sinha S, Bhatt BA, Dedousis N, O'Doherty RM. Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia*. 2008 Feb;51(2):336-46. Epub 2007 Dec 1.
90. Lee JY, Hwang DH. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. *Mol Cells*. 2006 Apr 30;21(2):174-85.

91. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:639803.
92. Takeda K, Akira S. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9.
93. Jialal I, Kaur H, Devaraj S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):39-48.
94. Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 May;17(4):319-26.
95. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006 May;23(5):469-80.
96. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.
97. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 606–612.
98. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3:213-223.
99. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2008 Nov;32(11):1720-4.
100. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 17;106(7):2365-70.

101. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008 Oct;88(4):894-9.
102. Arora S, Kaur IP, Chopra K, Rishi P. Efficiency of double layered microencapsulated probiotic to modulate proinflammatory molecular markers for the management of alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:11 pages.715130.
103. Peña JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol*. 2003 Apr;5(4):277-85.
104. Drissi F, Merhej V, Angelakis E, El Kaoutari A, Carrière F, Henrissat B, Raoult D. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr Diabetes*. 2014 Feb 24;4:e109.
105. Wakabayashi S, Hashii Y. Food and sugar preparation containing indigestible dextrin. Japanese Patent EP0582518 A2, Matsutani Chemical Industries Co. Ltd., 1994.
106. Yamashita H, Fujisawa K, Ito E, Idei S, Kawaguchi N, Kimoto M et al. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1236–1243.
107. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008 Apr;83(4):460-9.
108. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(4): 625-635.
109. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Biol Chem*. 2001;276(20):16683-9.

110. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metabol.* 2007;292(3):E740-747.
111. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
112. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem.* 2002 Aug;50(8):1013-21.
113. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 2004 Jun;25(3):426-57.
114. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000 Oct 19;407(6806):908-13.
115. LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13582-7.
116. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):23-30.
117. Mundinger TO, Cummings DE, Tabor sky GJ Jr. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. *Endocrinology.* 2006 Jun;147(6):2893-901.
118. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1714-9.
119. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):13-23.

120. Sangiao-Alvarellos S, Vazquez MJ, Varela L, Nogueiras R, Saha AK, Cordido F, Lopez M, Dieguez C. Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology* 150: 4562–4574, 2009.
121. Grill HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity*. 2006;14(Suppl 5):216S–21S.
122. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006; 443: 289-95.
123. Woods SC, Seeley RJ, Porte JR. D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998;280: 1378-83.
124. Ayala JE, Bracy DP, James FD, Julien BM, Wasserman DH, Drucker DJ. The glucagon-like peptide-1 receptor regulates endogenous glucose production and muscle glucose uptake independent of its incretin action. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1155-64.
125. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1680-7.
126. Näslund E, King N, Mansten S, Adner N, Holst JJ, Gutniak M, Hellström PM. Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *Br J Nutr*. 2004 Mar;91(3):439-46.
127. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S157-61.
128. Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S13-25.
129. Liber A, Szajewska H. Effects of inulin-type fructans on appetite, energy intake, and body weight in children and adults: systematic review of randomized controlled trials. *Ann Nutr Metab*. 2013;63(1-2):42-54.

130. Roberfroid MB: Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr* 2007, 137(11 Suppl):2493S-2502S. 63.
131. Kelly G: Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Altern Med Rev* 2008, 13(4):315-329.
132. Leonel AJ, Alvarez-Leite JL. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15: 474–479.
133. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2011; 45 Suppl: S120–127.
134. Nakamura Y, Natsume M, Yasuda A, Ishizaka M, Kawahata K, Koga J. Fructooligosaccharides suppress high-fat diet-induced fat accumulation in C57BL/6J mice. *Biofactors*. 2011 Jun 14.
135. Champ M, Hoebler C. Functional food for pregnant, lactating women and in perinatal nutrition: a role for dietary fibres? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12: 565–574.
136. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):1-10.
137. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51.
138. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr*. 1997; 127(5 Suppl):838S-841S.
139. Bernardis LL (1970) Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. *Experientia* 26, 789–90.
140. Stansbie D, Denton RM, Bridges BJ, Pask HT, Randle PJ. Regulation of pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase

activity in rat epididymal fat-pads. Effects of starvation, alloxan-diabetes and high-fat diet. *Biochem J.* 1976; 154(1):225-36.

141. Oller do Nascimento CM, Williamson DH. Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. *Biochem J.* 1986; 239: 233-236.

142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402–408.

9 ANEXOS

1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa na UNIFESP
2. Certificado de análises da oligofrutose distribuída pela empresa Viafarma (São Paulo, Brasil).