

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Vera Lúcia Lacerda Medeiros

Efeitos da suplementação com *Chlorella vulgaris* sobre a obesidade materna e o desenvolvimento da prole adulta alimentada com dieta hiperglicídica

**Montes Claros – Minas Gerais
2022**

Vera Lúcia Lacerda Medeiros

Efeitos da suplementação com *Chlorella vulgaris* sobre a obesidade materna e o desenvolvimento da prole adulta alimentada com dieta hiperglicídica

Dissertação para o Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde (PPGCS) da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: -Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador(a): Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade

**Montes Claros – Minas Gerais
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES

Reitor: Antônio Alvimar Souza

Vice-reitora: Ilva Ruas Abreu

Pró-reitora de Pesquisa: Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Sara Gonçalves Antunes de Souza

Pró-reitor de Pós-graduação: André Luiz Sena Guimarães

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Marcos Flávio Silveira Vasconcelos
D'Angelo

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Marcelo Perim Baldo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora: Cristina Andrade Sampaio

Coordenador Adjunto: Renato Sobral Monteiro Júnior

M488e

Medeiros , Vera Lúcia Lacerda.

Efeitos da suplementação com *Chlorella vulgaris* sobre a obesidade materna e o desenvolvimento da prole adulta alimentada com dieta hiperglicídica. [manuscrito] / Vera Lúcia Lacerda Medeiros – Montes Claros, 2022.

46 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2022.

Orientador: Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade.

1. *Chlorella vulgaris* - Dieta. 2. Algas como alimento. 3. Gravidez - Aspectos nutricionais. 4. Obesidade em mulheres. 5. Crianças - Aspectos nutricionais. I. Andrade, João Marcus Oliveira. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Universidade Estadual de Montes Claros

Mestrado e Doutorado em Ciências da Saúde

Anexo nº Folha Aprovação - Vera Lúcia - Dissertação/UNIMONTES/PRPG/PPGCS/2022

PROCESSO Nº 2310.01.0010191/2022-97

Folha Aprovação

DATA DA DEFESA: 30/08/2022 às 08:00 - webconferência, via plataforma Google Meet

NOME DO(A) DISCENTE: VERA LÚCIA LACERDA MEDEIROS

(x) Mestrado Acadêmico em Ciência Da Saúde

() Doutorado Acadêmico em Ciências Da Saúde

TÍTULO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC):

"EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHLORELLA VULGARIS SOBRE A OBESIDADE MATERNA E O DESENVOLVIMENTO DA PROLE ADULTA ALIMENTADA COM DIETA HIPERGLICÍDICA"

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

BANCA (TITULARES)

Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade ORIENTADOR (participação à distância por videoconferência)

Prof. Dr. Luiz Fernando de Rezende (participação à distância por videoconferência)

Prof. Dr. Rogério Estevam Farias (participação à distância por videoconferência)

BANCA (SUPLENTES)

Profª. Drª. Marise Fagundes Silveira

Profª. Drª. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira

A análise realizada pelos membros examinadores da presente defesa pública de TCC teve como resultado parecer de:

[x] **APROVAÇÃO**

[] **REPROVAÇÃO**



Documento assinado eletronicamente por **João Marcus Oliveira Andrade, Professor(a)**, em 31/08/2022, às 21:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando de Rezende, Professor de Educação Superior**, em 06/09/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogério Estevam Farias, Usuário Externo**, em 09/09/2022, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **51752399** e o código CRC **B2DCDAFB**.

A Deus, pela virtude de cada dia fazer-me mais forte para seguir nos meus propósitos, porém, nenhuma conquista haverá sem Ele...Ele sabe. Eterna gratidão.

Às minhas queridas e amadas filhas, Fernanda e Cecília que em todos os meus passos sempre estão do meu lado, uma corrente com elos que não se rompem. Junto a elas, minha família, minha mãe, exemplo de amor, carinho e fortaleza, ao meu pai, que tenho muita saudade e que me deixou um grande aprendizado, e aos meus irmãos, Menacles e Vânia.

Ao Prof. Dr. João Marcus, meu orientador, minha gratidão pela direção, pelo acolhimento, orientação e paciência. Um exemplo a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Unimontes e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, juntamente a todos que o compõem e contribuem para torná-lo excelência.

Agradeço aos companheiros e amigos de Curso, pelo trabalho em equipe e o compartilhamento do conhecimento.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo.

RESUMO

A obesidade materna tem apresentado incremento nas taxas de prevalência nas últimas décadas, especialmente devido mudanças de estilo de vida, como sedentarismo e dietas hipercalóricas. Tem associação com desfechos materno-fetais desfavoráveis e pode impactar no desenvolvimento da prole na vida adulta, predispondo a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. O estilo alimentar no período pré-gestacional, gravídico e lactário pode resultar em efeitos metabólicos para a mãe e para a prole. Nos últimos anos, vem crescendo a utilização de nutracêuticos no contexto da obesidade, assim a *Chlorella vulgaris* (CV), uma alga que contém vários nutrientes e compostos biologicamente ativos, com conhecidos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, que pode se tornar uma opção útil para auxiliar na prevenção e tratamento da obesidade, incluindo a materna. Diante desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de CV em camundongos fêmea no período gravídico-lactário sobre parâmetros corporais, metabólicos e moleculares materno e da prole adulta alimentada com dieta hiperglicídica. O estudo foi dividido em duas coortes, sendo a primeira realizada com 24 camundongos fêmea randomizados em três grupos: *i*) grupo controle (DP), *ii*) grupo alimentado com dieta hiperglicídica (DHG) e *iii*) grupo suplementado com CV (DHG+CV) no período gravídico-lactário. A segunda coorte compreendeu o acompanhamento das proles advindas dos animais da primeira coorte. Foram constituídos quatro grupos de animais machos (n=8/grupo), sendo DP/DP, DP/DHG, DHG/DHG e CV/DHG. Foram mensurados parâmetros corporais, bioquímicos e histológicos. Os resultados indicam que, nas mães, a CV foi capaz de diminuir o peso do tecido adiposo ovariano em relação do grupo DHG, no entanto, sem redução do peso e adiposidade corporal. Em relação ao perfil glicêmico, a CV foi capaz de melhorar a tolerância à glicose e diminuir os níveis de glicemia de jejum. Para o perfil lipídico, foram observadas diferenças para os níveis de colesterol total entre o grupo DP vs. DHG; para triglicerídeos, entre DP vs. DHG e DP vs. CV e para os níveis de LDL-c, as diferenças estatísticas foram encontradas entre DP vs. DHG e DHG vs. CV. Parâmetros fetais indicaram menor peso e comprimento ao nascimento nos animais oriundos de mães suplementadas com CV. Os resultados da análise de composição corporal da prole mostraram menor peso corporal, do tecido adiposo epididimal e da adiposidade visceral no grupo CV/DHG. Esses achados foram reforçados por menor tamanho dos adipócitos brancos. Para o perfil glicêmico da prole, não se observou benefícios com a suplementação de CV. Em relação ao perfil lipídico, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre CV/DHG e os grupos DP/DHG e DHG/DHG para os níveis de colesterol total. Para níveis de triglicerídeos, foram observadas diferenças entre o grupo DP/DP e os demais alimentados com dieta DHG, enquanto para LDL-c foram encontradas diferenças entre os grupos DP/DP vs. DP/DHG e DP/DHG vs. CV/DHG. Em conjunto, esses achados sugerem que a suplementação CV no período gravídico-lactário traz benefícios metabólicos para as mães e favorece fenótipo metabólico da prole, mesmo esta estando submetida a um ambiente obesogênico.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Obesidade. Obesidade materna. Metabolismo. Alimento funcional.

ABSTRACT

Maternal obesity has shown an increase in prevalence rates in recent decades, especially due to lifestyle changes, such as a sedentary lifestyle and hypercaloric diets. It is associated with adverse maternal-fetal outcomes and can impact the development of offspring in adult life, predisposing to obesity, diabetes and cardiovascular diseases. Feeding style in the pre-pregnancy, pregnancy and lactary period can result in metabolic effects in both mother and offspring. In recent years, the use of nutraceuticals in the context of obesity has increased, so *Chlorella vulgaris* (CV) an algae that contains several nutrients and biologically active compounds, with known antioxidant and anti-inflammatory effects, may become a useful option supporting prevention and treatment of obesity, including maternal. Thereby, the present study aims to evaluate the effects of CV supplementation in pregnant-lactary female mice on body, metabolic and molecular parameters of maternal and adult offspring fed with a high-glycemic diet. The study was divided into two cohorts, the first being carried out with 24 female mice randomized into three groups: i) control group (ST), ii) group fed with a hyperglycemic diet (HGD) and iii) group supplemented with CV (HGD+CV) in the pregnancy-lactary period. The second cohort comprised the follow-up of offspring from the animals of the first cohort. Four groups of male animals (n=8/group) were constituted, being ST/ST, ST/HGD, HGD/HGD and CV/HGD. Body, biochemical and histological parameters were measured. The results indicate that, in mothers, CV was able to decrease ovarian adipose tissue weight compared to the HGD group, however, without reducing weight and body adiposity. Regarding the glycemic profile, CV improved glucose tolerance and decreased fasting glucose levels. For the lipid profile, differences were observed for total cholesterol levels between the ST group vs. HGD; for triglycerides, between ST vs. HGD and ST vs. CV and for LDL-c levels, statistical differences were found between ST vs. HGD and HGD vs. CV. Fetal parameters indicated lower birth weight and length in animals from mothers supplemented with CV. The offspring's body composition analysis results showed lower body weight, epididymal adipose tissue and visceral adiposity in the CV/HGD group. These findings were reinforced by the smaller size of white adipocytes. For the glycemic profile of the offspring, no benefits were observed with CV supplementation. Regarding the lipid profile, statistically significant differences were observed between CV/HGD and the ST/HGD and HGD/HGD groups for total cholesterol levels. For triglyceride levels, differences were observed between the ST/ST group and the others fed with a HGD diet, while for LDL-c differences were found between ST/ST vs. ST/HGD and ST/HGD vs. CV/HGD. Altogether, these findings suggest that CV supplementation in the pregnancy-lactary period promotes metabolic benefits to mothers and favors the metabolic phenotype of the offspring, even when submitted to an obesogenic environment.

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Obesity. Maternal obesity. Metabolism. Functional food.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	15
3	PRODUTOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS	16
	Produto 1:.....	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO (S).....	46

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença epidêmica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, resultado de um desbalanço energético, sendo geralmente determinada quando o indivíduo apresenta Índice de Massa Corporal (IMC) maior ou igual a 30 Kg/m² (1). É responsável por desencadear outras doenças metabólicas, entre elas, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial primária e dislipidemias. Diversos fatores estão envolvidos na etiologia da obesidade, como ambientais (especialmente dietas ricas hipercalóricas e sedentarismo), genéticos, epigenéticos e culturais (2).

Estima-se que em 2016, 1,9 bilhão dos adultos apresentaram sobrepeso ou obesidade (3), sendo que até 2030 cerca de 38% da população adulta mundial estará acima do peso e outros 20% serão obesos (4). No Brasil, a prevalência de obesidade aumentou de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019, representando um aumento de 3,8% ao ano (5). Ademais, de 1990 a 2015, houve um aumento relativo de 28,3% na taxa global de morte relacionada ao IMC elevado, de 41,9 mortes por 100.000 habitantes em 1990 para 53,7 mortes por 100.000 habitantes em 2015 (6). O aumento da prevalência da obesidade impacta significativamente nos serviços de saúde, favorecendo o aumento de outras condições crônicas, incrementando gastos com serviços de saúde e afetando a cadeia de produtividade, devido aos anos de vida perdidos e gastos com seguridade social (6-9).

A fisiopatologia da obesidade é complexa e envolve diversos órgãos e tecidos, sendo o adiposo branco (TAB), o mais marcadamente afetado. O TAB é responsável pelo armazenamento de triacilgliceróis (reserva energética), isolamento térmico, proteção contra choque mecânicos e, especialmente, pela produção, liberação e ação (local e sistêmica) de adipocinas que exercem diversos efeitos moleculares (8, 28-30). Mais de 600 adipocinas são secretadas pelo TAB, influenciando a homeostase lipídica e glicêmica, modulando o apetite, a microbiota intestinal, a resposta imunológica e estabelecendo forte interação com outros órgãos e tecidos corporais (10-12). Por exemplo, no contexto da obesidade, a disfunção do TAB predispõe outras comorbidades, como o diabetes, o aumento da resistência à insulina, a doença hepática gordurosa não-alcoólica, dislipidemias e doenças cérebro-cardiovasculares, como acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio (13-15).

Em condições de eutrofia, o microambiente do tecido adiposo apresenta suficiente vascularização, sendo um sítio de produção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-4, IL-10 e IL-13) e, como consequência, hospeda uma variedade de células imunes, incluindo macrófagos M2, células linfoides inatas do tipo 2, células T auxiliares (Th2) e eosinófilos produtores de IL-4. Em resposta ao balanço energético positivo e consequente desenvolvimento da obesidade, os adipócitos sofrem hiperplasia e hipertrofia; e, à medida que o suprimento vascular se torna limitado, essas células entram em injúria e apoptose. Isso libera padrões moleculares associados a danos (DAMP) no microambiente, que desencadeiam a infiltração e ativação de células imunes inatas (por exemplo, células dendríticas, macrófagos e granulócitos). Esses efeitos promovem o desenvolvimento de estruturas semelhantes a coroas (CLS) e respostas imunes tipo 1 (pró-inflamatórias). Essa resposta inclui acúmulo de citocinas do tipo 1 (por exemplo, TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-6) e células imunes pró-inflamatórias, incluindo vários granulócitos, células linfoides inatas do tipo 1, células B e células T CD8+, que perpetuam respostas inflamatórias crônicas. Os macrófagos são altamente diversos dentro do tecido adiposo hipertrófico/hiperplásico; aqueles associados à CLS (CAM ϕ) proliferam e expressam os marcadores de superfície celular CD11c e CD9, enquanto aqueles que estão mais distantes (não-CAM ϕ) expressam o antígeno linfocitário 6C (Ly6C). Essas alterações inflamatórias coincidem com fibrose crônica e inflamação vascular, que se alimentam para sustentar um processo de inflamação contínuo, que se mantém localmente, que libera produtos na corrente sanguínea, interferindo na dinâmica de outros órgãos/tecidos (16), conforme ilustrado na Figura 1.

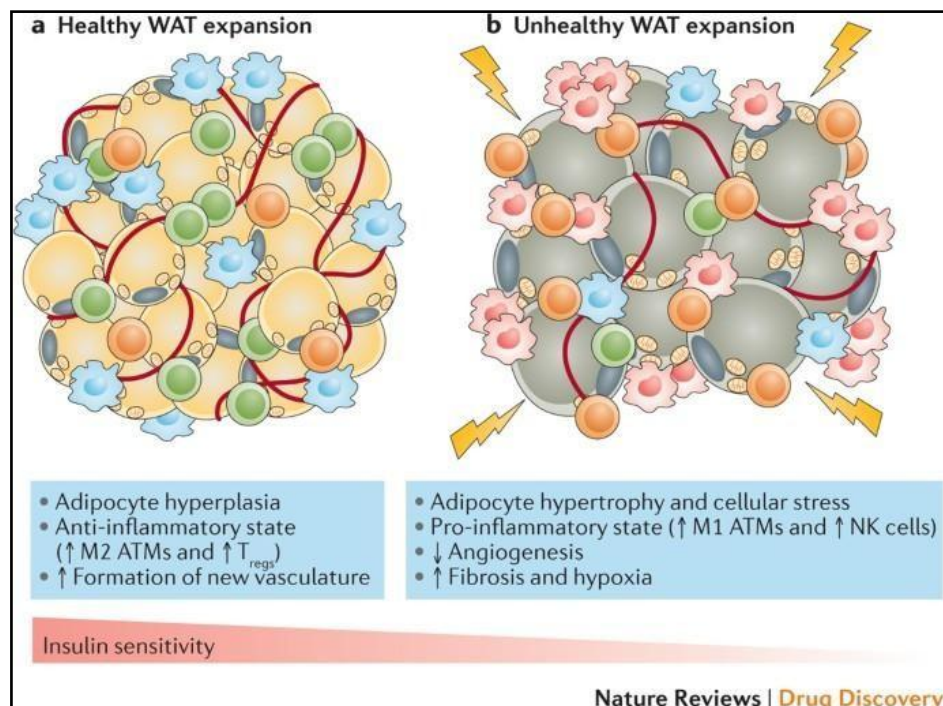


Figura 1. Comparação das características do tecido adiposo: a) saudável; b) patológico. Retirada de Kusminski, Bickel e Scherer (17).

A prevalência da obesidade aumentou substancialmente entre as mulheres em idade reprodutiva nas últimas duas décadas (18). Estimativas sugerem que em 2025 mais de 21% das mulheres do mundo em idade reprodutiva serão obesas (3). Além disso, em outro estudo foi mostrado que cerca de 40 milhões de gestantes estavam com sobrepeso ou obesidade no mundo em 2014, com significativo crescimento em países em desenvolvimento (19). A obesidade materna está associada ao maior risco de desenvolvimento de complicações maternas na gravidez (como doença hipertensiva específica da gravidez, diabetes gestacional e parto cesariana), de resultados perinatais adversos (prematuidade, morte fetal/neonatal, macrossomia) e de alterações metabólicas e corporais na prole na fase infantil e adulta, incluindo a própria obesidade (20-25).

O balanço energético positivo, de evolução crônica, que proporciona o desenvolvimento da obesidade, leva ao aumento do armazenamento de triglicerídeos e hipertrofia dos adipócitos, seguido de hiperplasia por adipogênese. O tecido adiposo secreta diversas citocinas e proteínas com ampla influência na função metabólica e fisiológica de outros órgãos e tecidos. A obesidade está, portanto, associada à inflamação crônica de baixo grau, importante no desenvolvimento da resistência à insulina, que parece ser a chave para o desenvolvimento de diversas complicações gestacionais associadas à obesidade (26, 27).

Antes e durante a gravidez, as mulheres com obesidade têm maior resistência à insulina do que as mulheres com peso normal (28). O aumento da resistência à insulina em gestantes com obesidade afeta todo o metabolismo glicídico, lipídico e proteico (29-31). Os mecanismos que levam à alteração da resistência à insulina durante a gravidez não estão bem caracterizados, mas acredita-se que incluam fatores como lactogênio placentário humano, hormônio de crescimento placentário e microRNA de origem placentária; diminuição da adiponectina e aumentos de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF α (29, 32-34). Independentemente da causa, ocorre uma rápida redução da resistência à insulina alguns dias após o parto, sugerindo que a placenta desempenha um papel central no processo (30). Dadas essas alterações inflamatórias e metabólicas, a obesidade está associada a uma série de complicações médicas relacionadas à gravidez (Figura 2).

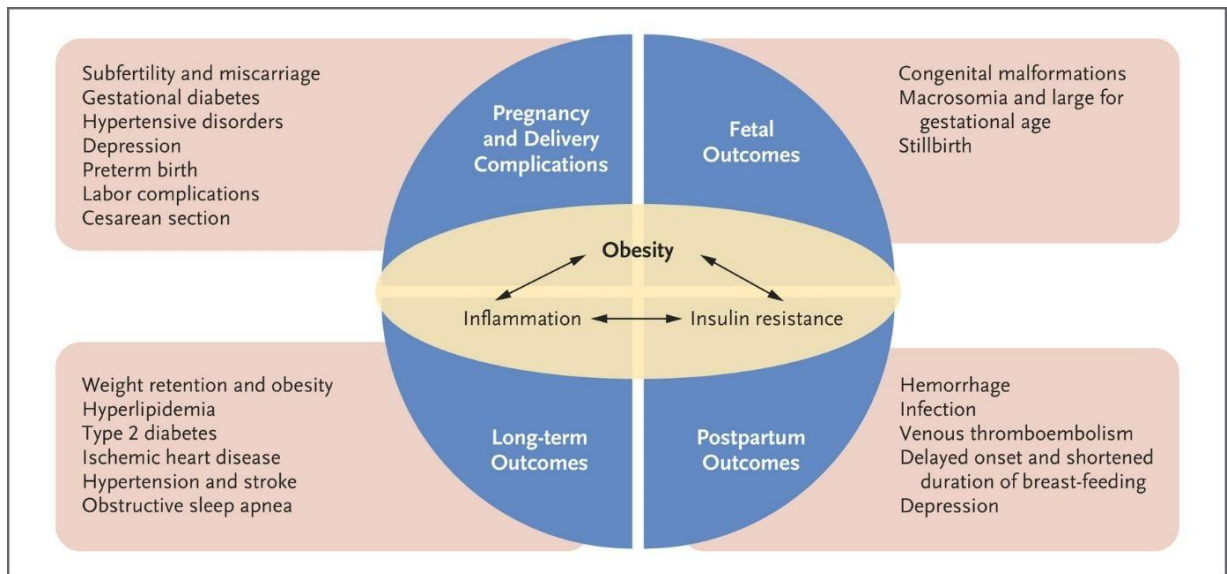


Figura 2. Gravidez, parto, pós-parto e desfechos maternos de longo prazo associados à obesidade. Retirada de Creanga et al. (35)

Além das implicações imediatas relacionadas ao desenvolvimento de complicações na gravidez, evidências crescentes mostram que a obesidade materna é um dos principais determinantes da saúde da prole durante a infância e vida adulta, influenciando características metabólicas e cognitivas (25, 36-39). No entanto, os mecanismos que relacionam a obesidade materna a implicações no desenvolvimento da prole ainda são pouco conhecidos. Estudos apoiam que os efeitos da obesidade materna sobre a prole são mediados, pelo menos em parte, por mudanças nos processos epigenéticos, como alterações na metilação do DNA e talvez por alterações no microbioma intestinal (40-43). Ademais, a obesidade materna pode implicar em alterações placentárias, por decorrência de aumento da inflamação e do estresse oxidativo, levando a alterações morfológicas e estruturais desse órgão (25) (Figura 3).

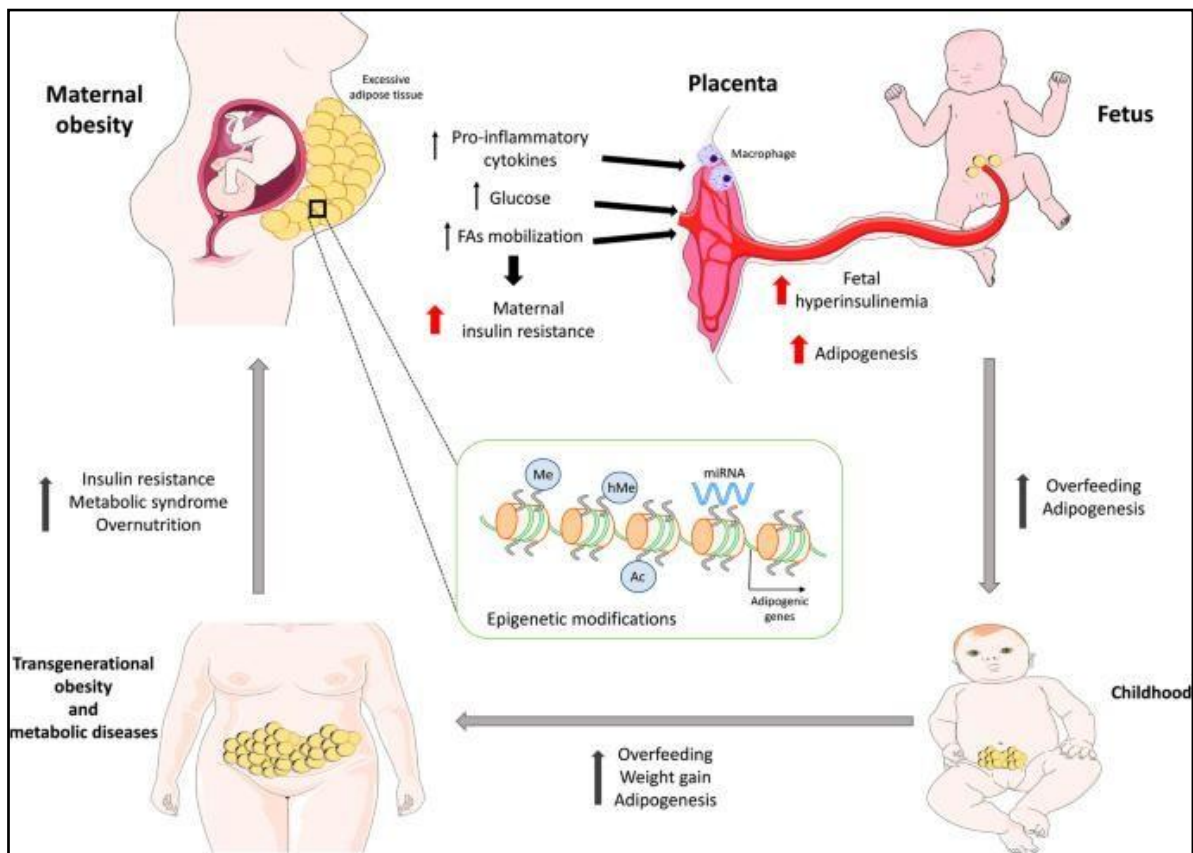


Figura 3. A interação dos efeitos da obesidade materna na placenta e no feto e suas consequências para a prole na vida adulta do ponto de vista epigenético. Retirada de Corrales et al. (40).

Tem-se tornado crescente o estudo do papel de nutracêuticos no metabolismo, especialmente em condições patológicas, como a obesidade e o diabetes. Nos últimos anos, emergiu forte interesse científico sobre a *Chlorella vulgaris* (CV), uma alga descoberta no século XIX e a partir dos anos 1950, especialmente na Ásia, passou a ser produzida comercialmente e ter suas propriedades nutricionais e medicinais fortemente conhecidas. Sabe-se que a CV contém vários nutrientes e compostos biologicamente ativos, sendo os efeitos de sua suplementação uma estratégia útil para a prevenção e controle de diversas condições patológicas (obesidade, diabetes, doença hepática gordurosa não-alcoólica), como evidenciado por diversos estudos científicos.

Em estudo de revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados sobre os efeitos da CV em distúrbios metabólicos relacionados à obesidade foi observado potenciais benefícios da alga (44). Em outros estudos, a CV associada a um programa de exercício físico em mulheres com sobrepeso/obesidade parece proporcionar diminuição da circunferência da cintura e melhorar

parâmetros lipídicos e trazer relativo benefício à biogênese mitocondrial (45, 46). Em estudos com modelos murinos, a CV foi capaz de melhorar a resistência à insulina e reduzir a expressão de marcadores inflamatórios no fígado, no contexto da doença hepática gordurosa não-alcoólica (47-50). Ainda, observam-se importantes benefícios da CV sobre o perfil lipídico, especialmente sobre os níveis de colesterol total e triglicerídeos (51, 52).

Diante da urgente necessidade de conhecimento de estratégias nutracêuticas que ajudem na prevenção e no tratamento da obesidade, dos potenciais efeitos da *Chlorella vulgaris* sobre o metabolismo corporal e da escassez de estudos que avaliem os efeitos deste composto sobre a saúde materna e da prole, o presente estudo levanta as seguintes questões norteadoras: a) a suplementação com *Chlorella vulgaris* no período gravídico-lactário em camundongos com obesidade pode imprimir uma resposta protetora à prole durante sua vida adulta quando submetida a mesma dieta indutora de obesidade? b) quais os efeitos que a *Chlorella vulgaris* exerceria sobre o metabolismo materno?

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da suplementação materna com *Chlorella vulgaris* sobre o metabolismo das mães e o desenvolvimento da prole submetida à alimentação com dieta hiperglicídica.

Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da *Chlorella vulgaris* sobre:

- a) composição corporal e consumo alimentar das mães e da prole;
- b) os perfis lipídico e glicêmico das mães e da prole;
- c) a morfologia do tecido adiposo branco das mães e da prole;
- d) parâmetros fetais, como número de filhos, peso e comprimento ao nascer.

3 PRODUTOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS

Produto 1: *Chlorella vulgaris* melhora parâmetros metabólicos de mães e prole alimentada com dieta hiperglicídica, submetido ao periódico Archives of Endocrinology and Metabolism (Qualis Capes na subárea interdisciplinar: B1)

3.1 Artigo 1

***Chlorella vulgaris* melhora parâmetros metabólicos de mães e prole alimentada com dieta hiperglicídica**

Vera Lúcia Lacerda Medeiros¹, João Marcus Oliveira Andrade^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Enfermagem. Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

A obesidade materna e o estilo alimentar no período gravídico-lactário podem resultar em efeitos de longo prazo na saúde metabólica da mãe e da prole, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes. A *Chlorella vulgaris* (CV) é uma alga que contém vários nutrientes e compostos biologicamente ativos, que a fazem possuir efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de CV em camundongos fêmea no período gravídico-lactário sobre parâmetros corporais, metabólicos e moleculares materno e da prole adulta alimentada com dieta hiperglicídica. O estudo foi dividido em duas coortes, sendo a primeira realizada com 24 camundongos fêmea randomizados em três grupos: *i*) grupo controle (DP), *ii*) grupo alimentado com dieta hiperglicídica (DHG) e *iii*) grupo suplementado com CV (DHG+CV) no período gravídico-lactário. A segunda coorte compreendeu o acompanhamento das proles advindas dos animais da primeira coorte. Foram constituídos quatro grupos de animais machos (n=8/grupo), sendo DP/DP, DP/DHG, DHG/DHG e CV/DHG. Foram mensurados parâmetros corporais, bioquímicos e histológicos. Nas mães, a CV foi capaz de diminuir a adiposidade corporal, melhorar a tolerância à glicose e os níveis de glicose e LDL-c. Na prole, observou diminuição do peso e adiposidade corporal e melhora da tolerância à glicose, níveis de glicose, colesterol total e LDL-c. Em conjunto, esses achados sugerem que a suplementação CV no período gravídico-lactário traz benefícios metabólicos para as mães e favorece fenótipo metabólico da prole, mesmo esta estando submetida a um ambiente obesogênico.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Obesidade materna. Metabolismo. Prole adulta.

ABSTRACT

Maternal obesity and diet during a pregnancy-lactary period can result in long-term effects on the metabolic health of the mother and offspring, increasing the risk of cardiovascular disease, obesity and diabetes. *Chlorella vulgaris* (CV) is an algae that contains several nutrients and biologically active compounds that confer antioxidant and anti-inflammatory effects. Thus, the present study aims to evaluate the effects of CV supplementation in pregnant-lactary female mice on the body, metabolic, and molecular parameters of maternal and adult offspring a fed with hyperglycemic diet. The study was divided into two cohorts, the first being formed by 24 female mice randomized into three groups: *i*) control group (ST), *ii*) group fed with a hyperglycemic diet (HGD) and *iii*) group supplemented with CV (HGD+CV) in the pregnancy-lactary period. The second cohort comprised the follow-up of offspring from the animals of the first cohort. Four groups of male animals were constituted (n=8/group), being ST/ST, ST/HGD, HGD/HGD and CV/HGD. Body, biochemical and histological parameters were measured. In mothers, CV was able to decrease body adiposity, improve glucose tolerance and glucose and LDL-c levels. In the offspring, there were a decrease in body weight and adiposity and an improvement in glucose tolerance, glucose levels, total cholesterol, and LDL-c. Altogether, these findings suggest that CV supplementation in the pregnancy-lactary period promotes metabolic benefits to the mothers and favors the metabolic phenotype of the offspring, even when submitted to an obesogenic environment.

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Maternal obesity. Metabolism. Adult offspring.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é o distúrbio metabólico mais comum e prevalente em todo o mundo, sendo importante fator associado a outras comorbidades, como doenças cardiovasculares e diabetes (1). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, quase 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso em 2016 e 13% eram obesos (2, 3). A obesidade é uma doença multifatorial e complexa, sendo caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal (4).

A obesidade materna é caracterizada por alterações no Índice de Massa Corporal (IMC) pré-gestacional e no ganho de peso gestacional excessivo, sendo influenciada por diversos fatores ambientais e socioeconômicos (1). Tanto a obesidade materna pré-gestacional quanto o ganho de peso gestacional excessivo aumentam a transferência placentária de nutrientes para o feto e afetam o desenvolvimento fetal, estando associadas a um risco aumentado de aborto espontâneo, diabetes gestacional, natimorto, pré-eclâmpsia levando a parto prematuro e cesariana (5-7).

Além das implicações relacionadas ao desenvolvimento de complicações na gravidez, estudos mostram a obesidade materna como um dos principais determinantes da saúde da prole. Um ambiente materno obesogênico, pré-gestacional, gestacional e lactário, aumenta o risco de desenvolvimento de obesidade e doenças cardiometabólicas na prole na fase adulta (7-9).

Os polifenóis dietéticos, metabólicos secundários encontrados em diversos alimentos, exibem uma ampla gama de efeitos fisiológicos benéficos à saúde, incluindo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Nos últimos anos, emergiu forte interesse científico sobre a *Chlorella vulgaris* (CV), uma alga descoberta no século XIX e que a partir dos anos 1950, especialmente na Ásia, passou a ser produzida comercialmente e ter suas propriedades nutricionais e medicinais fortemente conhecidas (10, 11).

Sabe-se que a CV contém vários nutrientes e compostos biologicamente ativos, sendo os efeitos de sua suplementação, uma estratégia útil para a prevenção e controle de diversas condições patológicas, como evidenciado por diversos estudos *in vivo*, especialmente devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (10-12). Estudos apontam que a CV pode influenciar o metabolismo lipídico/glicêmico e reduzir o peso corporal (13-17). Sobre a obesidade materna e efeitos sobre a prole, não se conhece os efeitos da CV.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação materna com CV, durante o período gravídico-lactário, e sua influência sobre o metabolismo materno e da prole alimentada com dieta hiperglicídica.

2 MATERIAS E MÉTODO

Desenho do estudo

Consiste em um estudo experimental dividido em duas coortes. **A coorte 1** foi constituída por 24 camundongos fêmea, primíparas, da linhagem Swiss, com seis semanas de vida divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de dieta recebida: *i*) dieta padrão (DP; n=8 animais) e *ii*) dieta hiperglicídica (DHG; n=16 animais), durante 12 semanas para indução da obesidade. Após esse período, o grupo DHG foi subdividido em dois grupos: DHG e DHG + *Chlorella vulgaris* (DHG+CV) e todos os animais foram acasalados na proporção 1 macho / 2 fêmeas. Logo após a identificação do tampão mucoso vaginal (sinal de presunção da prenhez), foi iniciada a suplementação diária com CV na dose de 500 mg/Kg de animal (Puravida, Brasil), via gavagem orogástrica, estendendo-se pelo período gravídico/lactário, que compreendeu seis semanas) (Figura 1). Após o desmame, as proles foram randomizadas em novos grupos de estudo, constituindo a coorte 2. **A coorte 2** foi realizada com 32

camundongos machos de quatro semanas de idade, divididos em quatro grupos (n=8 animais/grupo); sendo formado dois grupos a partir do grupo de mães ST, um mantido com dieta padrão e outro alimentado com dieta hiperglicídica; para as proles originadas das mães DHG e DHG+CV, ambas foram mantidas apenas com dieta hiperglicídica, com objetivo de estimular um ambiente dietético obesogênico. O acompanhamento da prole aconteceu durante 12 semanas.

Os grupos foram mantidos em gaiolas (41x34x18 cm; n=4/5 animais por gaiola), sob ciclo de luminosidade (claro-escuro) de 12/12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60\pm 5\%$, e baixo nível sonoro $<40\text{ dB}$, além de livre acesso à dieta e água. No experimento foi usada dieta padrão (grupo DP) composta 65,8% de carboidratos, 3,1% de gorduras e 31,1% de proteínas, contendo 4,0 Kcal/g e dieta hiperglicídica (DHG) é composta por 45% de leite condensado, 10% de açúcar refinado e 45% da dieta padrão; a composição de macronutrientes é de 74,2% de carboidratos, 5,8% de gorduras e 20% de proteínas, contendo 4,4 Kcal/g; a DHG possui alto teor de carboidratos refinados (primariamente sacarose) quando comparada à dieta DP; desse modo, tendo importantes propriedades de indução de ganho de gordura corporal e de alterações metabólicas (18-20).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal (CEEBEA) da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil (nº 200/2020).

Mensuração do peso corporal e do consumo alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram mensurados duas vezes por semana, em dias e horários fixos e previamente definidos (terça-feira e sexta-feira, às 8:00), usando balança semi-analítica. Para o peso corporal foram registrados os

valores por animal, em gramas, ao longo de todo o tempo do experimento, bem como as médias por grupo em cada dia de mensuração. Em relação ao consumo alimentar em calorias, foi obtida a média por grupo, sendo corrigida pelo peso corporal e pelo intervalo de dias (consumo alimentar final – consumo alimentar inicial = x; x/animais por gaiola/número de dias = y; y/peso corporal médio do grupo no período de avaliação).

Ultrassonografia do tecido adiposo gonadal

As imagens de ultrassonografia da espessura do tecido adiposo gonadal dos camundongos fêmea (mães) foram obtidas na última semana da fase de indução de obesidade para comprovar as alterações da adiposidade corporal induzida pela dieta hiperglicídica. Os animais foram anestesiados usando Quetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (30 mg/Kg) (Ceva Santé Animale®, Brazil), via intraperitoneal, e em seguida submetidos à tricotomização da região abdominal. Para aquisição das imagens, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, usou-se o aparelho ultrassonográfico GE LOGIQ e com transdutor de alta frequência L8-18i (GE Healthcare, EUA). Todas as imagens foram realizadas no modo de brilho fundamental (modo B), com otimização de ganho e as configurações de compensação de ganho de tempo foram mantidas constante ao longo do experimento.

Teste intraperitoneal de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

O teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipTTG) foi realizado após jejum noturno de 12 horas, usando injeção intraperitoneal de glicose hipertônica a 50% peso/volume (Samtec®, Brasil) na dose de 2g/Kg de peso corporal. Foram obtidas amostras de sangue periférico através de pequeno corte na porção distal da cauda dos

animais, em um volume estimado em 5-10 μ L por coleta, nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção para mensuração dos níveis de glicose, usando glicosímetro Accu-Chek (Roche Diagnostics[®], USA).

O teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina (ipTSI) foi realizado pela manhã, com os animais em estado alimentado. Os animais receberam insulina 100UI/mL (Insulin N[®], Novo Nordisk) na dose de 0,75UI/Kg de peso corporal, sendo mensurados os valores de glicose nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção. Os procedimentos de coleta e análise dos níveis de glicose foram semelhantes aos descritos para o ipTTG.

Eutanásia e análise da composição corporal

Após jejum noturno de 12 horas, os animais foram anestesiados usando Cloridrato de Ketamina 100mg/Kg e Xilazina 30mg/Kg por via intraperitoneal e em seguida, foram submetidos à eutanásia pela técnica de decapitação por guilhotina. Imediatamente após o sacrifício, foram obtidas amostras de sangue total e realizadas as coletas de tecido adiposo branco (epididimal, mesentérico, retroperitoneal e inguinal) e marrom. O índice de adiposidade corporal (%) foi calculado a partir da fórmula: \sum peso dos tecidos epididimal, mesentérico e retroperitoneal (g)/peso do animal (g) x 100. Os pesos dos tecidos adiposos inguinal e marrom foram corrigidos pelo peso corporal do animal em gramas: peso do tecido adiposo (g)/peso do animal (g).

Determinação de parâmetros bioquímicos

O soro foi obtido após centrifugação do sangue total a 3.200 rpm por 10 minutos e armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas. Foram avaliados níveis de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, glicose e

insulina usando kits específicos (In Vitro Diagnostica®, Brasil) e analisados no aparelho Humastar 200 (In Vitro Diagnostica®, Brasil). Os níveis de lipoproteína de alta densidade baixa densidade (LDL) foi calculado usada a fórmula proposta por Friedewald.

Análises histológicas

Após o sacrifício dos animais, um fragmento de tecido adiposo epididimal e um fragmento do tecido marrom de cada animal foram lavados com solução salina e, em seguida, imersos em solução de formol 10% tamponado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo e corados com hematoxilina & eosina (H&E). A visualização dos cortes e a captação de imagens foram feitas em microscópio FSX100 Inverted Microscope (Olympus®, Japão).

Análises estatísticas

Os dados foram expressos em médias±erro padrão da média (SEM) e analisados usando o programa estatísticos *GraphPad Prism* versão 7.0, sendo inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, comparações múltiplas foram realizadas usando *One-way* ANOVA teste seguido do pós-teste de Turkey. Para as análises dos testes ipGTT e ipIST foi usando o teste *Two-way* ANOVA. Consideraram-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os resultados mostraram que a dieta hiperglicídica induziu satisfatoriamente a obesidade, como observado nas Figuras 2A-C. O grupo DHG apresentou maior peso corporal (DP: $39,57 \pm 2,98$ vs. DHG: $43,41 \pm 2,08$ - $p < 0,0001$; Figura 2A) e variação do peso corporal entre o início e fim do período de indução de obesidade (DP: $7,45 \pm 1,69$ vs. DHG: $13,17 \pm 1,50$ - $p < 0,0001$; Figura 2B). Adicionalmente, foi observada maior espessura do coxim de tecido adiposo ovariano nos animais do grupo DHG (DP: $0,77 \pm 0,04$ vs. DHG: $0,83 \pm 0,03$ - $p = 0,002$; Figura 2C). Foi observado maior consumo alimentar (Kcal/dia/grama de animal) no grupo DHG (DP: $0,66 \pm 0,09$ vs. DHG: $0,95 \pm 0,34$; $p = 0,0002$; Figura 2D).

No período gravídico-lactário, os animais suplementados com CV não apresentaram diferenças no peso corporal e na adiposidade corporal total, mas tiveram diminuição da adiposidade corporal (Figuras 3C). No entanto, foi observada diminuição do tecido adiposo ovariano (DP: $0,023 \pm 0,015$; DHG: $0,062 \pm 0,007$; CV: $0,045 \pm 0,015$; $p = 0,002$; Figura 3D). Não foi observada diferença estatisticamente significativa no consumo alimentar no período gravídico-lactário (Figura 3E).

O perfil glicêmico dos animais da primeira coorte mostrou melhora da tolerância à glicose (Figura 4A) e menores níveis de glicose de jejum (DP: $96,67 \pm 9,15$; DHG: $119,20 \pm 8,0$; CV: $105,0 \pm 5,55$; $p = 0,0005$; Figura 4B) para os animais do grupo CV em relação aqueles DHG. Para a sensibilidade insulínica e níveis de insulina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figuras 4C-D). Para o perfil lipídico, foram observadas diferenças para os níveis de colesterol total entre o grupo DP vs. DHG (DP: $170,8 \pm 18,58$; DHG: $200,7 \pm 8,0$; CV: $182,2 \pm 10,8$; $p = 0,0049$; Figura 5A); para triglicerídeos, entre DP vs. DHG e DP vs. CV (DP: $64,17 \pm 5,41$; DHG: $77,33 \pm 8,71$; CV: $77,83 \pm 8,08$; $p = 0,0101$; Figura 5B) e para os níveis de LDL-c, as

diferenças estatísticas foram encontradas entre DP vs. DHG e DHG vs. CV (DP: $108,3 \pm 14,2$; DHG: $139,7 \pm 8,4$; CV: $120,3 \pm 14,5$; $p=0,0024$; Figura 5D). Para HDL-c não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 5C).

Dados de nascimento da prole mostraram não haver diferenças em relação ao tamanho da prole (DP: $7,37 \pm 4,34$; DHG: $8,37 \pm 1,59$; CV: $10,88 \pm 2,41$; $p=0,079$), apesar da tendência de maior número de animais no grupo CV. Os fetos originados de mães suplementadas com CV apresentaram menor peso (DP: $1,72 \pm 0,22$; DHG: $1,51 \pm 0,23$; CV: $1,31 \pm 0,25$; $p<0,0001$) e comprimento (DP: $43,46 \pm 2,99$; DHG: $41,7 \pm 2,58$; CV: $39,96 \pm 2,85$; $p=0,0001$) ao nascimento em relação aos grupos DP e DHG.

Os resultados de análise de composição corporal das proles acompanhadas por 12 semanas mostraram que os animais oriundos de mães suplementadas com CV apresentaram menor peso corporal, de tecido adiposo epididimal e de adiposidade visceral (Figuras 6A-C). Esses achados foram reforçados por menor tamanho dos adipócitos brancos (Figura 6). Para o consumo alimentar em Kcal/dia não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 6D).

Para o perfil glicêmico, foi evidenciado piora da tolerância à glicose e sensibilidade insulínica nos animais DP/DHG em relação aos demais grupos; no entanto, não se observou diferenças entre os grupos DHG/DHG vs. CV/DHG (Figuras 7A-C). Para os níveis de insulina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 7D). Os resultados de análise do perfil lipídico indicaram diferenças estatisticamente significativas entre CV/DHG e os grupos DP/DHG e DHG/DHG, para os níveis de colesterol total (DP/DP: $183,2 \pm 12,64$; DP/DHG: $215,0 \pm 9,55$; DHG/DHG: $207,0 \pm 8,09$; CV/DHG: $189,2 \pm 8,35$; $p<0,0001$; Figura 8A). Para os níveis de triglicerídeos foram observadas diferenças entre o grupo DP/DP e os demais alimentados com dieta DHG (Figura 8B). Para os níveis de LDL-c foram encontradas

diferenças entre os grupos DP/DP vs. DP/DHG e DP/DHG vs. CV/DHG (DP/DP: $117,9 \pm 14,57$; DP/DHG: $151,7 \pm 13,54$; DHG/DHG: $137,4 \pm 11,53$; CV/DHG: $119,3 \pm 9,51$; $p=0,0003$; Figura 8D). Para os níveis de HDL-c não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figuras 8C).

4 DISCUSSÃO

A obesidade materna pode contribuir com importantes desfechos metabólicos desfavoráveis para a prole, especialmente quando essa é submetida a um ambiente dietético obesogênico. A identificação de estratégias nutricionais que auxiliem na minimização dos efeitos deletérios da obesidade emerge como um promissor campo de investigação científica. Assim, foi hipotetizado que o uso da CV no período gravídico-lactário de mães obesas poderia melhorar parâmetros metabólicos maternos e na prole adulta. O presente estudo evidenciou, de forma inédita, que a CV foi capaz de induzir nas mães, diminuição do peso e da adiposidade corporal, melhora da tolerância à glicose, diminuição dos níveis de triglicerídeos, colesterol total e glicemia, além de hipotrofia dos adipócitos. Na prole, observou-se menor peso e adiposidade corporal, diminuição dos níveis de colesterol total e hipotrofia dos adipócitos.

Os efeitos antropométricos da CV sobre a composição corporal ainda são pouco conhecidos. Em nosso estudo, foram observados efeitos da CV sobre o peso e adiposidade corporal materna e da prole. Corroborando, estudo de Sanayei *et al.* mostrou que a associação de CV ao treino físico foi capaz de proporcionar redução da circunferência da cintura (14). Em outro estudo, também envolvendo mulheres obesas associando treino físico com CV, foi mostrado redução da adiposidade corporal e melhora da biogênese mitocondrial (16). Já em estudo com ratos alimentados com dieta rica em gordura, a CV nas concentrações de 5% e 10% foi capaz de modular o peso

corporal (15). Possivelmente, uma importante explicação para a associação entre CV e redução do peso e adiposidade, esteja associada ao incremento da biogênese mitocondrial e da atividade termogênica, além da melhora da resistência à insulina (16, 21).

Em relação aos parâmetros associados aos perfis glicêmico e lipídico, nosso estudo evidenciou importantes benefícios da CV. Em consonância aos nossos achados, em estudo de revisão sistemática e metanálise foi mostrado que a CV foi capaz de diminuir em 7,47 mg/dL os níveis séricos de colesterol total e em 7,71 mg/dL para LDL-c, no entanto sem efeitos sobre os níveis de triglicerídeos e HDL-c (22). Em camundongos, a administração de CV previne a dislipidemia induzida por dieta rica em gordura, reduzindo os níveis de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos livres (21). De forma complementar, ratos suplementados com CV apresentaram melhora do perfil lipídico (23).

A CV é uma rica fonte de carotenóides, como luteína, zeaxantina e beta-caroteno. Foi demonstrado que os carotenóides podem se ligar aos receptores de LDL-c devido às semelhanças estruturais entre os carotenóides e o colesterol (24). Outra explicação pode ser postulada devido à grande quantidade de fibras na CV, que interferem na absorção de gorduras no intestino (15). Na primeira coorte, foi observado que o grupo CV apresentou maiores níveis de triglicerídeos em relação ao grupo controle. Esse achado pode ser explicado pela composição de macronutrientes da CV, sendo que análise química realizada por Hasegawa et al. revelou que a CV contém 44,4g de proteínas, 39,5g de carboidratos e 15,4g de lipídeos em cada 100g de peso seco (25). Sabe-se que a alta ingestão de carboidratos pode aumentar os ácidos graxos livres no sangue e, posteriormente, os triglicerídeos circulantes.

Sobre o perfil glicêmico foi evidenciado importante papel da CV na obesidade materna e da prole. Estudo de Vecina et al. demonstrou que a CV foi capaz de melhorar a sensibilidade e tolerância à glicose em camundongos alimentados com dieta rica em gordura através do aumento dos níveis de fosforilação de proteínas como IR, IRS-1 e Akt (21). Estudo de Moradi et al. mostrou que a CV foi capaz de reduzir a expressão de marcadores inflamatórios no fígado, melhorar a hiperglicemia e sensibilidade à insulina na doença hepática gordurosa não-alcoólica (15), sendo ratificado por outros estudos (26, 27).

Em nosso estudo, foi observado que a prole oriunda de mães suplementadas com CV foi protegida, em diversos aspectos, dos efeitos deletérios de um ambiente obesogênico induzido pelo consumo de dieta hiperglicídica. Uma possível explicação para esses achados, e que não foram investigados em nosso estudo, certamente envolve o papel da CV na modulação de processos epigenéticos. Os processos epigenéticos estão emergindo como um importante mecanismo através do qual a memória epigenética, que representa uma associação entre as características determinadas pelo DNA e diferentes exposições ambientais sobre esse material genético, se relaciona com diversas consequências para vários órgãos e sistemas. Modificações epigenéticas têm sido propostas como um mecanismo que liga a adiposidade materna aos resultados na prole. Além disso, agora, estão surgindo evidências de que processos epigenéticos podem atuar em três ou mais gerações e através da linha paterna (28-30).

Em resumo, o presente estudo abre uma importante perspectiva na compreensão do papel da CV no metabolismo materno e da prole, no contexto da obesidade. Assim, a utilização da CV no período gravídico-lactário pode trazer benefícios para saúde materna e, por consequência, imprimir uma programação metabólica protetora na prole adulta, mesmo sob um ambiente obesogênico. O presente estudo ainda carece de

aprofundamento na realização de análises moleculares em tecidos vitais, como placenta, fígado e adiposo branco e marrom.

Figuras

Figura 1.

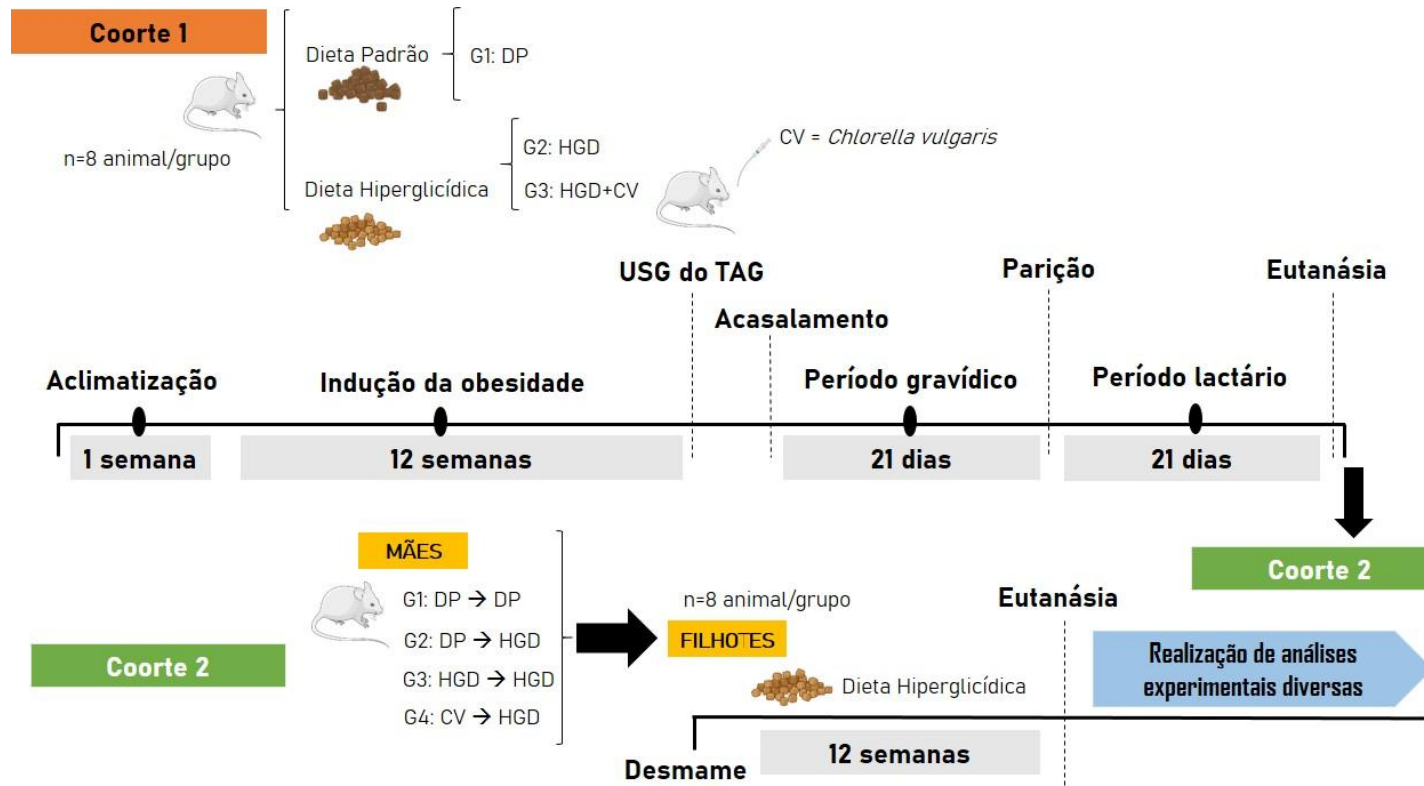


Figura 1. Linha do tempo do estudo. DP: dieta padrão; HGD: dieta hiperglicídica; HGD+CV: dieta hiperglicídica + *Chlorella vulgaris*; USG: ultrassonografia; TAG: tecido adiposo gonadal; CV: *Chlorella vulgaris*.

Figura 2.

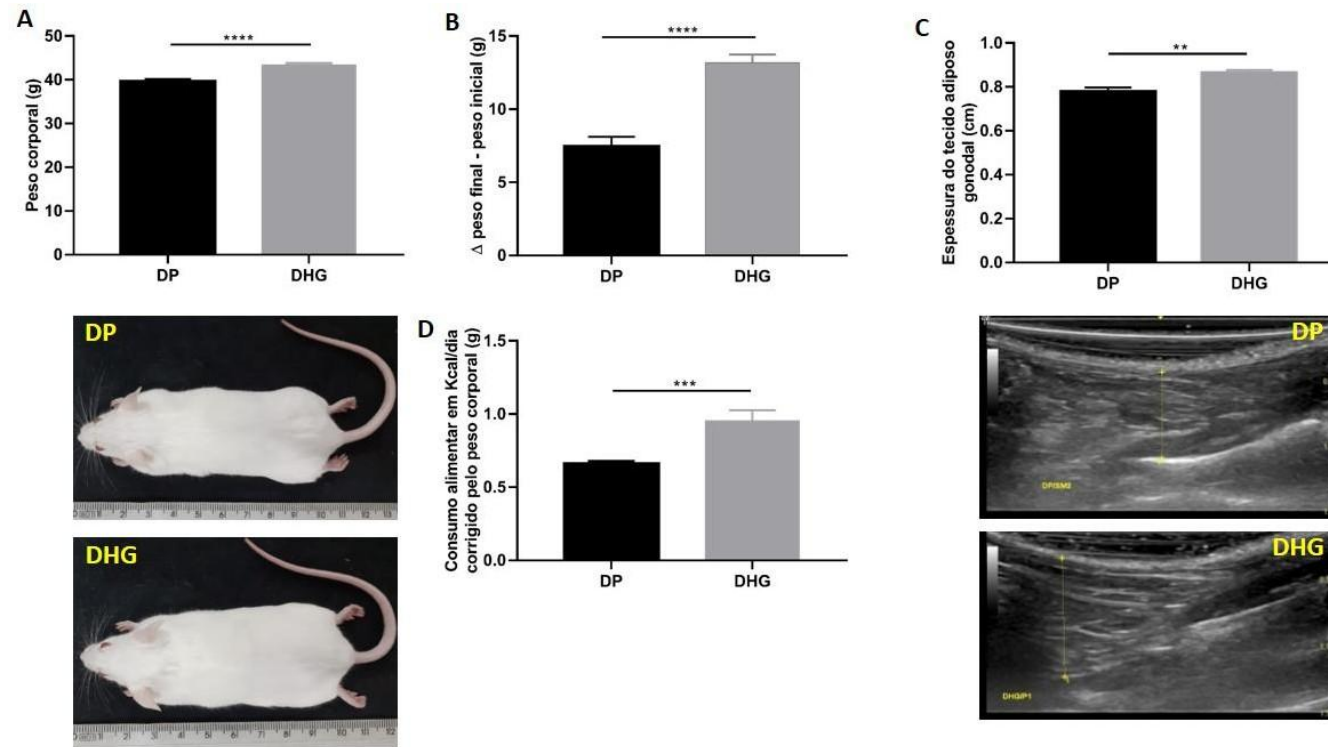


Figura 2. Composição corporal e consumo alimentar no período de indução da obesidade. Peso corporal em gramas (A), variação em gramas do peso corporal (final – inicial) (B), espessura do coxim do tecido adiposo gonadal (C), consumo alimentar em Kcal/animal/dia corrigida pelo peso corporal (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=8 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Dados analisados por *One-way ANOVA test e pós-teste de Bonferroni*.

Figura 3.

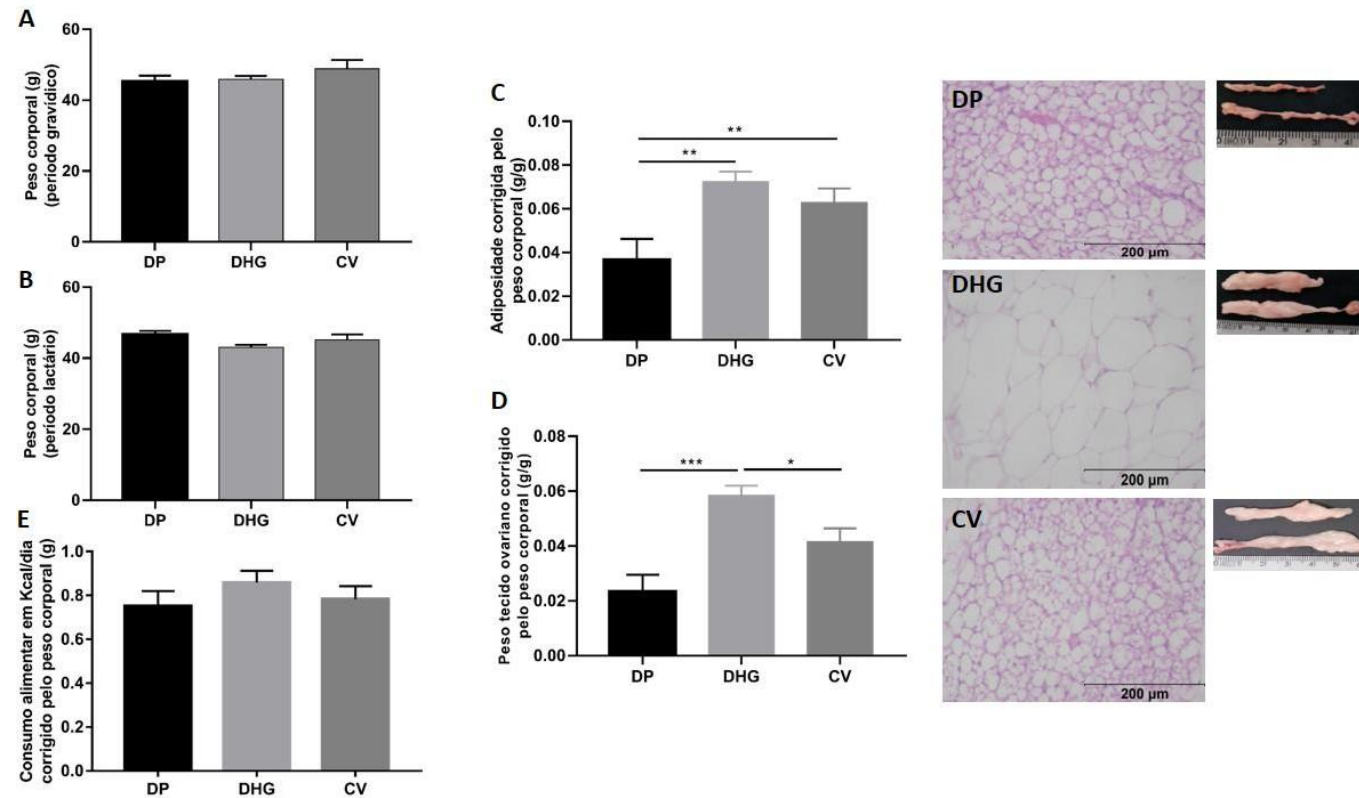


Figura 3. Efeitos da CV sobre a composição corporal e consumo alimentar no período gravídico-lactário. Peso corporal em gramas no período gravídico (A), peso corporal no período lactário (B), adiposidade visceral corrigida pelo peso corporal (C), peso do tecido adiposo ovariano corrigido pelo peso corporal (D), consumo alimentar em Kcal/animal/dia corrigida pelo peso corporal (E). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=8 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Dados analisados por *One-way ANOVA test* e *pós-teste de Bonferroni*.

Figura 4.

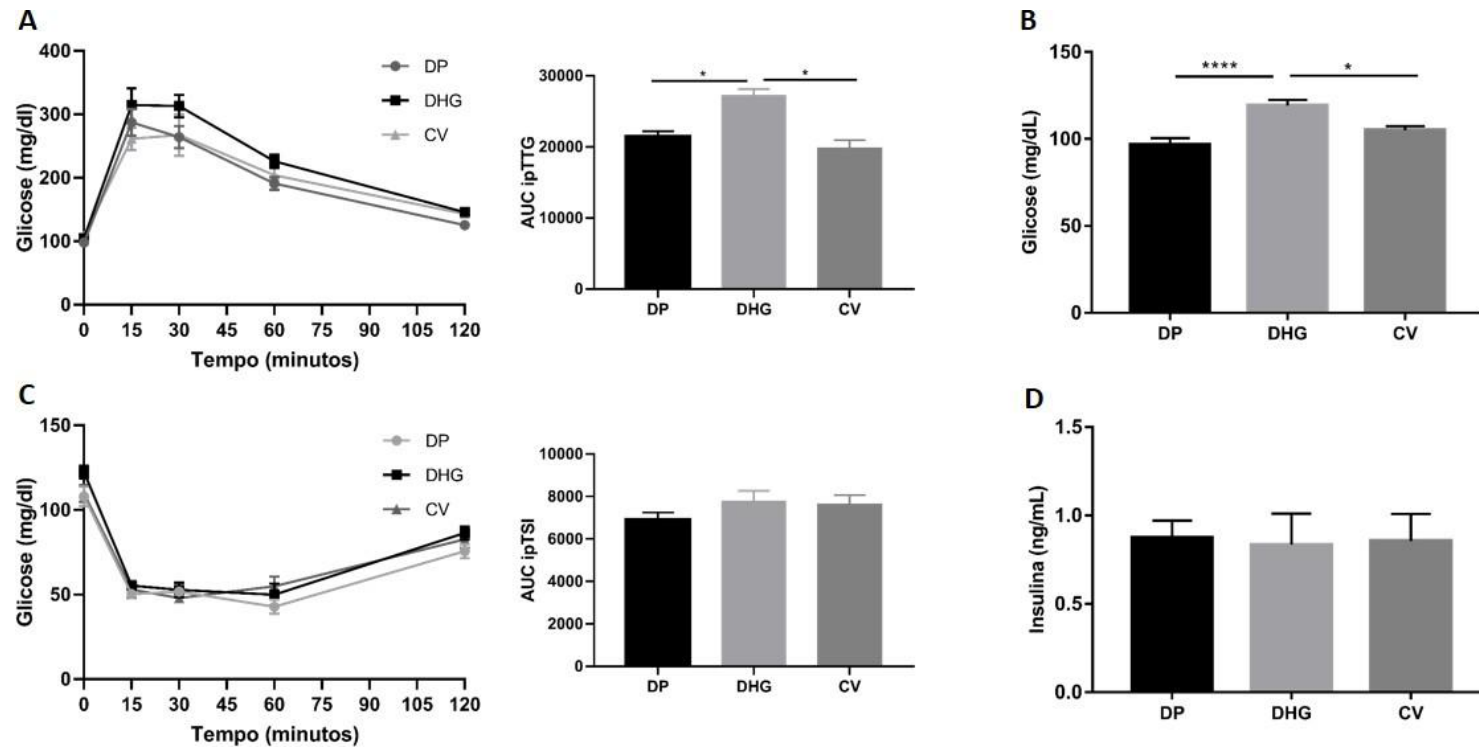


Figura 4. Efeitos da CV sobre o perfil glicêmico materno. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose glicemia de jejum e área sobre a curva (AUC) (A), glicemia de jejum (B), teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina e área sobre a curva (AUC) (C), insulina sérica (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Dados analisados por *One-way ANOVA test* para (C) e (D) e por *Two-Way Anova test* para (A) e (B) e *pós-teste de Bonferroni*.

Figura 5.

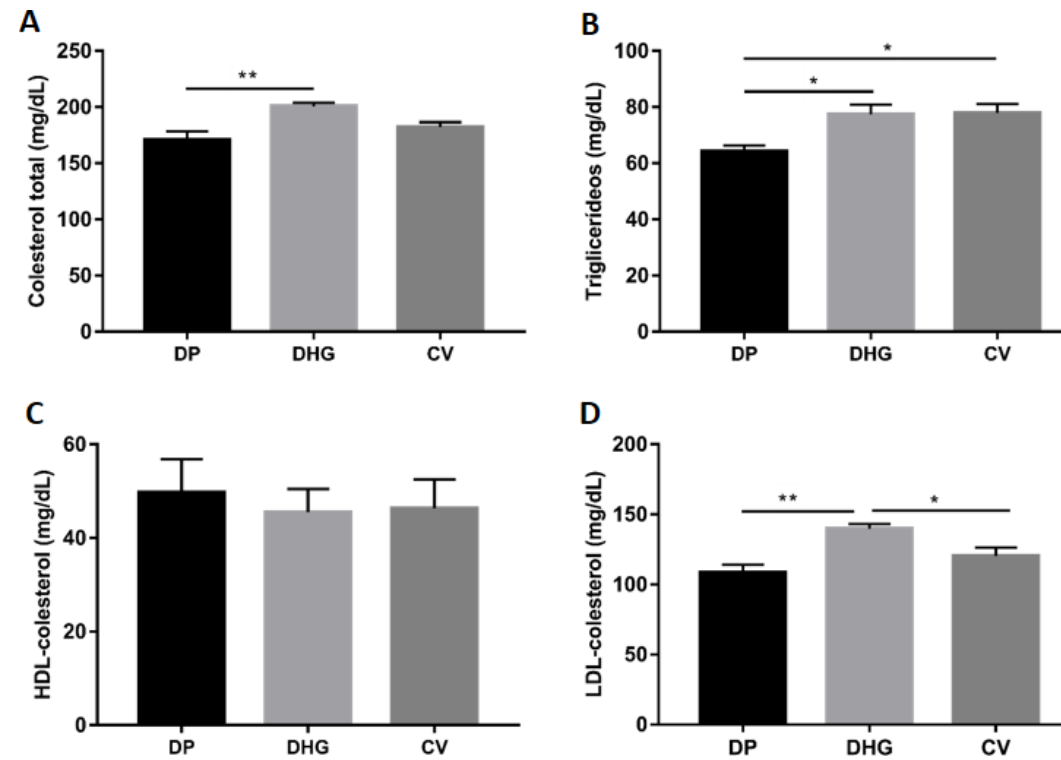


Figura 5. Efeitos da CV sobre o perfil lipídico materno. Colesterol total (A), triglicerídeos (B), HDL-c (C), LDL-c (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Dados analisados por *One-way ANOVA test* e *pós-teste de Bonferroni*.

Figura 6.

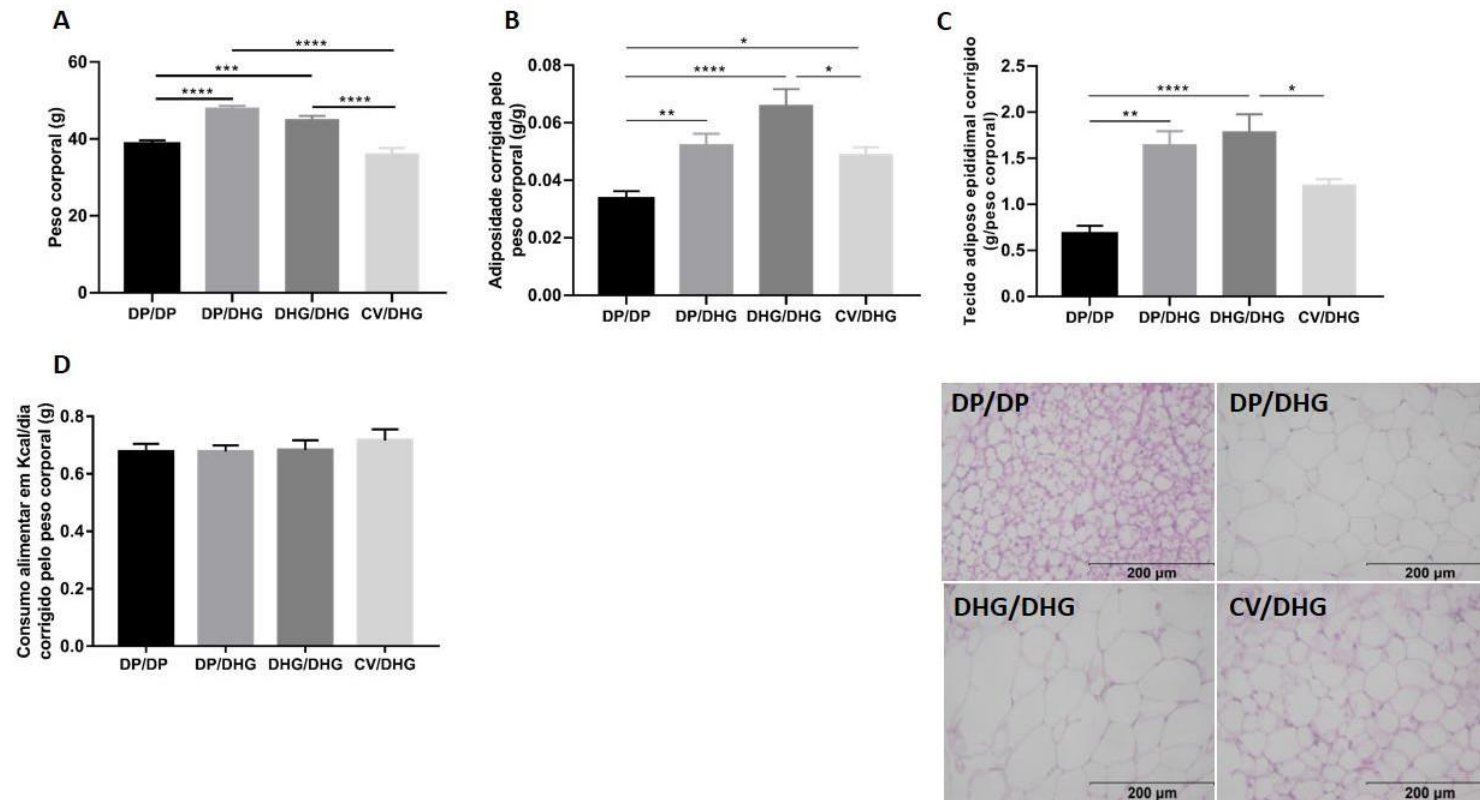


Figura 6. Composição corporal e consumo alimentar da prole. Peso corporal (A), adiposidade corporal (B), peso do tecido adiposo epididimal corrigido pelo peso corporal (C), consumo alimentar em Kcal/animal/dia corrigida pelo peso corporal (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=8 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Dados analisados por *One-way ANOVA test e pós-teste de Bonferroni*.

Figura 7.

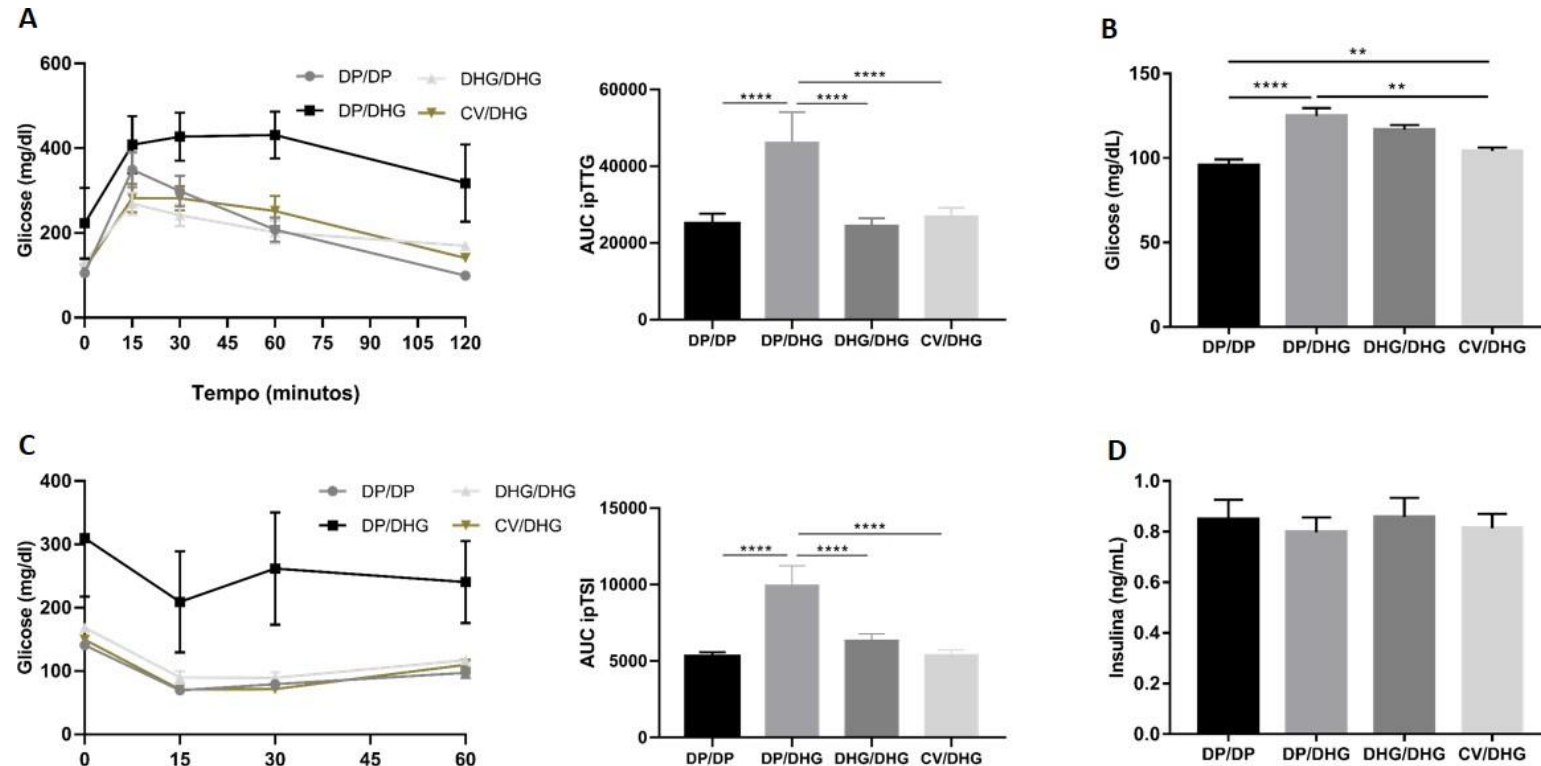


Figura 7. Efeitos da CV sobre o perfil glicêmico da prole. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose glicemia de jejum e área sobre a curva (AUC) (A), glicemia de jejum (B), teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina e área sobre a curva (AUC) (C), insulina sérica (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Dados analisados por *One-way ANOVA test* para (C) e (D) e por *Two-Way Anova test* para (A) e (B) e *pós-teste de Bonferroni*.

Figura 8.

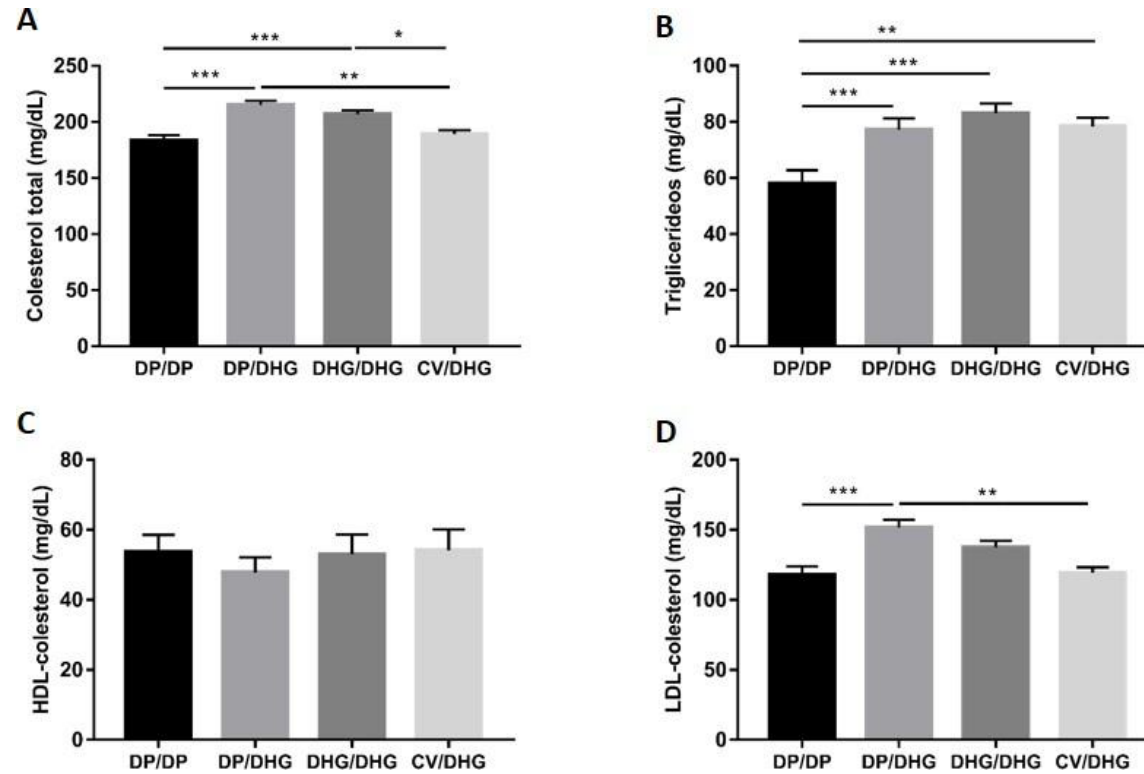


Figura 8. Efeitos da CV sobre o perfil lipídico da prole. Colesterol total (A), triglicerídeos (B), HDL-c (C), LDL-c (D). Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média (n=6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas como *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Dados analisados por *One-way ANOVA test* e *pós-teste de Bonferroni*.

REFERÊNCIAS

1. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17034.
2. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(5):288-98.
3. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current obesity reports*. 2015;4(3):363-70.
4. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*. 2017;376(3):254-66.
5. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal Body Mass Index and the Risk of Fetal Death, Stillbirth, and Infant Death: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2014;311(15):1536-46.
6. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2014;311(15):1536-46.
7. Leddy MA, Power ML, Schulkin J. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2008;1(4):170-8.
8. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VW, Eriksson JG, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(1):53-64.
9. Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, Corvalán C, Uauy R, Herring S, et al. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2016;4(12):1025-36.
10. Song SH, Kim IH, Nam TJ. Effect of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* on proliferation of IEC-6 cells. *International journal of molecular medicine*. 2012;29(5):741-6.
11. An HJ, Rim HK, Jeong HJ, Hong SH, Um JY, Kim HM. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2010;32(4):585-92.
12. de Melo RG, de Andrade AF, Bezerra RP, Viana Marques DdA, da Silva VA, Paz ST, et al. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. *Journal of Applied Phycology*. 2019;31(6):3653-63.
13. Jong-Yuh C, Mei-Fen S. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*. 2005;77(9):980-90.
14. Sanayei M, Izadi A, Hajizadeh-Sharafabad F, Amirsasan R, Kaviani M, Barzegar A. *Chlorella vulgaris* in combination with high intensity interval training in overweight and obese women: a randomized double-blind clinical trial. 2021;20(1):781-92.
15. Moradi MN, Behrouj H, Alipoor B, Kheiripour N, Ghasemi H, Ghasemi H. *Chlorella vulgaris* is an effective supplement in counteracting non-alcoholic fatty liver disease-related complications through modulation of dyslipidemia, insulin resistance, and inflammatory pathways. 2021;45(10):e13914.
16. Sanayei M, Hajizadeh-Sharafabad F, Amirsasan R, Barzegar A. High-intensity interval training with or without *chlorella vulgaris* supplementation in obese and overweight women: effects on mitochondrial biogenesis, performance and body composition. *The British journal of nutrition*. 2021:1-11.
17. Sanayei M, Kalejahi P, Mahinkazemi M, Fathifar Z, Barzegar A. The effect of *Chlorella vulgaris* on obesity related metabolic disorders: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of complementary & integrative medicine*. 2021.

18. Menezes-Garcia Z, Oliveira MC, Lima RL, Soriani FM, Cisalpino D, Botion LM, et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. *Obesity*. 2014;22(3):663-72.
19. de Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Arifa RD, de Paula TP, Andrade JM, Santos SH, et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(9):978-85.
20. Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MCC, Soriani FM, Pinho V, Faria AMC, et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*. 2013;21(9):E396-E406.
21. Vecina JF, Oliveira AG, Araujo TG, Baggio SR, Torello CO, Saad MJ, et al. Chlorella modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Life Sci*. 2014;95(1):45-52.
22. Sherafati N, Bideshki MV, Behzadi M, Mobarak S, Asadi M, Sadeghi O. Effect of supplementation with *Chlorella vulgaris* on lipid profile in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*. 2022;66:102822.
23. Lee HS, Park HJ, Kim MK. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Nutrition research and practice*. 2008;2(4):204-10.
24. Gammone MA, Riccioni G, D'Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food & nutrition research*. 2015;59:26762.
25. Hasegawa T, Yoshikai Y, Okuda M, Nomoto K. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Immunopharmacology*. 1990;12(8):883-91.
26. Ebrahimi-Mameghani M, Sadeghi Z, Abbasalizad Farhangi M, Vaghef-Mehrabany E, Aliashrafi S. Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2017;36(4):1001-6.
27. Lee HS, Kim MK. Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Journal of medicinal food*. 2009;12(5):1029-37.
28. Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G. Obesity and pregnancy, the perfect metabolic storm. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2021;75(12):1723-34.
29. Reichetzeder C. Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2021;75(12):1710-22.
30. Breton CV, Landon R, Kahn LG, Enlow MB, Peterson AK, Bastain T, et al. Exploring the evidence for epigenetic regulation of environmental influences on child health across generations. *Communications Biology*. 2021;4(1):769.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a suplementação com *Chlorella vulgaris* durante o período gravídico-lactário foi capaz de proporcionar às mães diminuição do peso do tecido adiposo ovariano, dos níveis de LDL-c, melhorar a tolerância à glicose e diminuir os níveis de glicose de jejum. Já na prole, observou-se ao nascimento que a CV foi capaz de levar a maiores ninhadas, mas com menor peso e comprimento. Ademais, na vida adulta, a CV trouxe relativa proteção contra a obesidade induzida por dieta, através de menor peso corporal, do tecido adiposo epididimal e da adiposidade visceral, associados ao menor tamanho dos adipócitos brancos. Também foram observadas reduções dos níveis de colesterol total e LDL-c com a suplementação com CV. Para o perfil glicêmico, observou-se benefícios com a suplementação com a alga em relação ao grupo DP/DHG. Em conjunto, esses achados sugerem que a suplementação CV no período gravídico-lactário traz benefícios metabólicos para as mães e favorece fenótipo metabólico da prole, mesmo esta estando submetida a um ambiente obesogênico. Assim, o estudo abre importantes perspectivas científicas na identificação dos efeitos da CV sobre a obesidade materna e seu impacto no metabolismo da prole. Estimula-se o desenvolvimento de estudos complementares que envolvam a compreensão dos efeitos moleculares da CV e do seu papel no metabolismo humano para maior embasamento científico das propriedades nutracêuticas dessa alga no contexto da saúde materna e fetal/prole.

REFERÊNCIAS

1. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17034.
2. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*. 2017;376(3):254-66.
3. Collaboration NCDRF. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017;390(10113):2627-42.
4. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008;32(9):1431-7.
5. Silva LESd, Oliveira MMd, Stopa SR, Gouvea EdCDP, Ferreira KRd, Santos RdO, et al. Tendência temporal da prevalência do excesso de peso e obesidade na população adulta brasileira, segundo características sociodemográficas, 2006-2019. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2021;30.
6. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(1):13-27.
7. Bahia L, Coutinho ESF, Barufaldi LA, de Azevedo Abreu G, Malhão TA, Ribeiro de Souza CP, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012;12(1):440.
8. de Oliveira ML, Santos LM, da Silva EN. Direct healthcare cost of obesity in Brazil: an application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. *PloS one*. 2015;10(4):e0121160.
9. Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2011;12(2):131-41.
10. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(2):85-97.
11. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:802078.
12. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
13. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(5):367-77.
14. Divella R, Mazzocca A, Daniele A, Sabbà C, Paradiso A. Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer. *International journal of biological sciences*. 2019;15(3):610-6.
15. Oikonomou EK, Antoniades C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nature reviews Cardiology*. 2019;16(2):83-99.
16. Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nature reviews Endocrinology*. 2019;15(3):139-54.
17. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(9):639-60.
18. Obesity in Pregnancy: ACOG Practice Bulletin, Number 230. *Obstetrics and gynecology*. 2021;137(6):e128-e44.

19. Chen C, Xu X, Yan Y. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. *PloS one*. 2018;13(8):e0202183.
20. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2014;311(15):1536-46.
21. Gaillard R, Durmus B, Hofman A, Mackenbach JP, Steegers EA, Jaddoe VW. Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Obesity*. 2013;21(5):1046-55.
22. Ruager-Martin R, Hyde MJ, Modi N. Maternal obesity and infant outcomes. *Early human development*. 2010;86(11):715-22.
23. Cnattingius S, Villamor E, Johansson S, Edstedt Bonamy AK, Persson M, Wikstrom AK, et al. Maternal obesity and risk of preterm delivery. *Jama*. 2013;309(22):2362-70.
24. Gaudet L, Ferraro ZM, Wen SW, Walker M. Maternal obesity and occurrence of fetal macrosomia: a systematic review and meta-analysis. *BioMed research international*. 2014;2014:640291.
25. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VW, Eriksson JG, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(1):53-64.
26. Huda SS, Brodie LE, Sattar N. Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2010;15(2):70-6.
27. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008;37(3):753-68, x-xi.
28. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(4):903-16.
29. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*. 2006;49(7):1677-85.
30. Waters TP, Kim SY, Sharma AJ, Schnellinger P, Bobo JK, Woodruff RT, et al. Longitudinal changes in glucose metabolism in women with gestational diabetes, from late pregnancy to the postpartum period. *Diabetologia*. 2020;63(2):385-94.
31. CATALANO P, PRESLEY L, DE MOUZON SH, KALHAN S. Longitudinal Changes in Amino Acid (AA) Turnover in Pregnancy in Women with Normal Glucose Tolerance (NGT) and GDM—Relationship to Fetal Growth. *Diabetes*. 2018;67(Supplement_1).
32. McIntyre HD, Zeck W, Russell A. Placental growth hormone, fetal growth and the IGF axis in normal and diabetic pregnancy. *Current diabetes reviews*. 2009;5(3):185-9.
33. Alvarado-Flores F, Kaneko-Tarui T, Beyer W, Katz J, Chu T, Catalano P. Placental miR-3940-3p Is Associated With Maternal Insulin Resistance in Late Pregnancy. 2021;106(12):3526-35.
34. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, et al. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 2002;51(7):2207-13.
35. Creanga AA, Catalano PM, Bateman BT. Obesity in Pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 2022;387(3):248-59.
36. Eriksson JG, Sandboge S, Salonen M, Kajantie E, Osmond C. Maternal weight in pregnancy and offspring body composition in late adulthood: findings from the Helsinki Birth Cohort Study (HBCS). *Annals of medicine*. 2015;47(2):94-9.

37. Chandrasekaran S, Neal-Perry G. Long-term consequences of obesity on female fertility and the health of the offspring. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2017;29(3):180-7.
38. Contu L, Hawkes CA. A Review of the Impact of Maternal Obesity on the Cognitive Function and Mental Health of the Offspring. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5).
39. Glastras SJ, Chen H, Pollock CA, Saad S. Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. *Bioscience reports*. 2018;38(2).
40. Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G. Obesity and pregnancy, the perfect metabolic storm. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2021;75(12):1723-34.
41. Gohir W, Ratcliffe EM, Sloboda DM. Of the bugs that shape us: maternal obesity, the gut microbiome, and long-term disease risk. *Pediatric Research*. 2015;77(1):196-204.
42. Reichetzeder C. Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2021;75(12):1710-22.
43. Breton CV, Landon R, Kahn LG, Enlow MB, Peterson AK, Bastain T, et al. Exploring the evidence for epigenetic regulation of environmental influences on child health across generations. *Communications Biology*. 2021;4(1):769.
44. Sanayei M, Kalejahi P, Mahinkazemi M, Fathifar Z, Barzegar A. The effect of *Chlorella vulgaris* on obesity related metabolic disorders: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of complementary & integrative medicine*. 2021.
45. Sanayei M, Izadi A, Hajizadeh-Sharafabad F, Amirsasan R, Kaviani M, Barzegar A. *Chlorella vulgaris* in combination with high intensity interval training in overweight and obese women: a randomized double-blind clinical trial. 2021;20(1):781-92.
46. Sanayei M, Hajizadeh-Sharafabad F, Amirsasan R, Barzegar A. High-intensity interval training with or without *Chlorella vulgaris* supplementation in obese and overweight women: effects on mitochondrial biogenesis, performance and body composition. *The British journal of nutrition*. 2021:1-11.
47. Jong-Yuh C, Mei-Fen S. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*. 2005;77(9):980-90.
48. Vecina JF, Oliveira AG, Araujo TG, Baggio SR, Torello CO, Saad MJ, et al. *Chlorella* modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Life Sci*. 2014;95(1):45-52.
49. Moradi MN, Behrouj H, Alipoor B, Kheiripour N, Ghasemi H, Ghasemi H. *Chlorella vulgaris* is an effective supplement in counteracting non-alcoholic fatty liver disease-related complications through modulation of dyslipidemia, insulin resistance, and inflammatory pathways. 2021;45(10):e13914.
50. Ebrahimi-Mameghani M, Sadeghi Z, Abbasalizad Farhangi M, Vaghef-Mehrabany E, Aliashrafi S. Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2017;36(4):1001-6.
51. Sherafati N, Bideshki MV, Behzadi M, Mobarak S, Asadi M, Sadeghi O. Effect of supplementation with *Chlorella vulgaris* on lipid profile in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*. 2022;66:102822.
52. Lee HS, Kim MK. Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Journal of medicinal food*. 2009;12(5):1029-37.

ANEXO (S)

Anexo A. certificado consubstanciado da Comissão de Experimentação e Bem-estar Animal da Universidade Estadual de Montes Claros.

