

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/11/2019.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Influência de um produto probiótico à
base de soja sobre a composição da
microbiota intestinal de camundongos
submetidos à dieta hiperlipídica**

Juliana de Carvalho Marchesin

Araraquara
2017

Influência de um produto probiótico à base de soja sobre a composição da microbiota intestinal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Juliana de Carvalho Marchesin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Araraquara
2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M316i Marchesin, Juliana de Carvalho
Influência de um produto probiótico à base de soja sobre a composição da microbiota intestinal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica / Juliana de Carvalho Marchesin. – Araraquara, 2017.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciências dos Alimentos.

Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

1. Obesidade. 2. Probiótico. 3. Microbiota intestinal. 4. Citocinas inflamatórias.
I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 50700006

JULIANA DE CARVALHO MARCHESIN

Influência de um produto probiótico à base de soja sobre a composição da microbiota intestinal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 30 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

VIVIAN MARQUES MIGUEL SUEN

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência


AMANDA MARTINS BAVIERA

Dedico este trabalho a Deus por iluminar o meu caminho e me proporcionar força, coragem e fé. Aos meus pais, Luiz Fernando e Sandra por me incentivarem a conquistar os meus sonhos e serem meus maiores exemplos na busca da ciência e do saber.

Aos meus irmãos e companheiros de caminhada, Rafael e Giovana, que me ensinam a todo instante a nunca desistir em meio às dificuldades da vida.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;

À Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pela orientação, ensinamentos e confiança durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço pela paciência e por me incentivar nesta caminhada, já visto o quão grande é seu amor à pesquisa;

À Roseli Aparecida Pinto, Josiane Márcia Maria Canaan, Adriano Ferreira Luiz e Renildo Moreira de Almeida pelo companheirismo, ensinamentos, amizade e contribuições durante os trabalhos executados no Laboratório de Pesquisa em Probióticos (Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) - UNESP, Araraquara, Brasil);

Às amigas de laboratório, Larissa Celiberto, Olívia Zordão, Mariana Nougalli, Izabela Cozentino, Virgínia Lordello, Bruna Brandi, Mika Kajiwara e Camila Imamura, pela amizade, colaboração em experimentos e pelas palavras de motivação e carinho;

À Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e ao discente Allan Botinhon Orlando, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) - UNESP, Araraquara, Brasil, pelos ensinamentos e por me auxiliarem nas análises imunológicas;

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio e ao técnico José Antônio Zuanon do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia (FOAR) - UNESP, Araraquara, Brasil, pelas dicas, contribuições e participação nas análises histológicas;

À Elisabete Zocal Paro Lepera (Departamento Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, UNESP, Araraquara) à Beatriz Buda Fuller, ao Celso Luiz Borsato (Biotério Central - UNESP, Araraquara), à Valéria Aparecida de Araujo Mallavolta (Departamento de Ciências Biológicas - UNESP, Araraquara) por toda ajuda e ensinamentos; e às discentes Paula Ferreira e Amanda Fernandes, por se mostrarem disponíveis para me auxiliar quando as solicitei;

Ao Antônio Reina e a todos os funcionários da Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja (UniverSoja) - DAN (UNESP, Araraquara, Brasil), por disponibilizarem semanalmente as amostras de extrato aquoso de soja utilizadas durante todo o protocolo experimental;

Ao Dr. Andrey Santos, biologista no Laboratório de Investigação Clínica de Resistência à Insulina da Faculdade de Ciências Médicas (LICRI) - UNICAMP, Campinas, Brasil, e à Sylvia Helena Monteiro Silva pelas dicas

em biologia molecular e por colaborarem com as análises de microbiota fecal;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN) - UNESP, e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, por toda a infraestrutura e apoio;

À Seção Técnica da Pós-graduação;

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAr) - UNESP, Araraquara;

Aos funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

“Somos caminhantes, peregrinos a caminho. Devemos, pois, sentir-nos insatisfeitos com o que somos se queremos chegar àquilo que aspiramos.”

(Santo Agostinho, Sermão 169, 15,18)

Resumo

Objetivo: analisar o efeito de um produto à base de extrato aquoso de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, sobre a composição da microbiota fecal, variação de peso corporal e parâmetros inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. **Métodos:** O protocolo experimental teve duração de 10 semanas sendo utilizados camundongos machos Swiss (Unib: SW) com oito semanas de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10): C (controle negativo) - animais alimentados com dieta padrão para roedores (DP); OB (controle positivo) - animais induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica (DHL - 61,01% do valor energético total de lipídios); OBF (fermentado probiótico) - animais induzidos à obesidade por DHL e que receberam o produto fermentado probiótico; OBP (placebo) - animais induzidos à obesidade por DHL e que receberam o produto placebo (sem os cultivos microbianos). A bebida probiótica e o produto placebo foram produzidos semanalmente e a viabilidade das cepas *E. faecium* CRL 183, *L. helveticus* 416 e *B. longum* ATCC 15707 foi determinada imediatamente após o preparo do produto probiótico (T0) e com sete dias de armazenamento à temperatura de refrigeração (5 °C). Ao longo do protocolo experimental foram monitorados os seguintes parâmetros: ingestão hídrica e de ração (diariamente), variação do peso corporal (semanalmente) e verificação da glicemia de jejum (final do protocolo). A composição da microbiota intestinal foi avaliada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) no início e no final do protocolo. Após a eutanásia dos animais, as deposições de tecido adiposo branco intra-abdominal (gordura retroperitoneal e epididimal) foram removidas para determinação da massa, área e diâmetro dos adipócitos e níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo (IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e TNF- α). **Resultados:** Foi constatado que a população média de células viáveis dos microrganismos probióticos utilizados no processo fermentativo permaneceu acima de 8,0 logUFC.mL⁻¹ durante todo o protocolo experimental. O grupo OBF se destacou por apresentar peso médio inferior ao do grupo OB até a 9ª semana do estudo (p<0,05). A análise histológica evidenciou maior área e diâmetro dos adipócitos nos grupos alimentados por DHL, porém dentre estes, o grupo OBF apresentou valores significativamente menores. Embora a glicemia de jejum não tenha apresentado diferença entre os grupos OB, OBF e OBP (p<0,05), os marcadores inflamatórios indicaram aumento significativo de IL-6 e IL-10 nos grupos OBF e OBP quando comparado aos grupos controles negativo e positivo, além disso, houve maior expressão de TGF- β no grupo OBP (p<0,05). A análise da microbiota por qPCR demonstrou que os animais induzidos à obesidade apresentaram aumento na proporção do gênero *Lactobacillus* spp. (pertencente ao filo *Firmicutes*), no entanto, a administração do produto probiótico (grupo OBF) contribuiu com o equilíbrio da microbiota intestinal ao manter a proporção de microrganismos do filo *Bacteroidetes* e promover um aumento na população de *Bifidobacterium* spp. **Conclusão:** Nas condições do estudo, a ingestão regular da bebida

probiótica foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal, o tamanho dos adipócitos e promover uma melhora no perfil imunológico e no equilíbrio da microbiota fecal dos animais, atuando positivamente no controle da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade; Probiótico; Microbiota intestinal; Citocinas inflamatórias.

Abstract

Aim: to investigate the effect of an aqueous soy extract beverage, fermented with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* 416, supplemented with *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, on the composition of fecal microbiota, change in body weight and inflammatory parameters of mice submitted to a hyperlipidic diet. **Methods:** The length of the experimental protocol was 10 weeks, and it was performed using Swiss type male mice (Unib: SW) at eight weeks of age. The animals were divided into four groups (n = 10): C (negative control) - animals fed with a standard diet for rodents; OB (positive control) - animals induced to obesity by a high-fat diet (HFD - 61.01% of the total energetic value of lipids); OBF (beverage fermented with probiotics) - animals induced to obesity by HFD, that also was fed with the probiotic fermented product; OBP (placebo) - animals induced to obesity by HFD, that also was fed with the placebo product (the same product without microbial cultures). The beverage fermented with probiotics and the placebo product were produced weekly and the viability of its microbial strains (*E. faecium* CRL 183, *L. helveticus* 416 and *B. longum* ATCC 15707) was determined immediately after its preparation (T0) and after seven days of storage at controlled temperature (5 °C). During the experimental protocol, the following parameters were monitored: water and food intake (daily), body weight variation (weekly) and fasting glycemia (at the end of the protocol). The composition of the intestinal microbiota was evaluated by Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) at the beginning, middle and at the end of the protocol. After the animals' euthanasia, the deposition of intra-abdominal white adipose tissue (retroperitoneal and epididymal fat) was removed to determine the mass, area and diameter of adipocytes and levels of pro and anti-inflammatory cytokines in the adipose tissue (IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β and TNF- α). **Results:** The OBF group showed a lower mean weight than the OB group until the 9th week of the study (p <0.05). The histological analysis evidenced a larger area and diameter of the adipocytes in the groups fed by HFD, however, among these, the OBF group showed significantly lower values. Although fasting glycemia did not differ between OB, OBF and OBP groups (p <0.05), inflammatory markers indicated a significant increase in IL-10 and IL-6 within the OBF and OBP groups when compared to the negative and positive control groups, in addition, there was higher expression of TGF- β in the OBP group (p<0.05). Analysis of fecal microbiota by qPCR showed that animals which were induced to obesity had an increase in the proportion of

the genus *Lactobacillus* spp. (belonging to the *Firmicutes* phylum), moreover, administration of the beverage fermented with probiotic (OBF group) appeared to contribute to intestinal balance by maintaining the proportion of the *Bacteroidetes* phylum microorganisms and promoting a subtle increase in the number of bifidobacteria. **Conclusion:** Under the conditions of the study, the regular intake of the probiotic beverage could reduce body weight gain, the size of adipocytes and promote an improvement in immune profile and balance of the fecal microbiota of animals, acting positively in the control of obesity.

Key-words: Obesity; Probiotic; Gut microbiota; Inflammatory cytokines

Sumário

1 Introdução.....	12
1.1 <i>Microbiota intestinal.....</i>	14
1.2 <i>Obesidade e microbiota intestinal.....</i>	17
1.3 <i>Probióticos e modulação da obesidade.....</i>	21
Capítulo 1. Efeito de uma bebida probiótica à base de soja sobre a composição da microbiota fecal e variação de ponderal em camundongos induzidos à obesidade.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1 Introdução.....	28
2 Material e métodos.....	30
2.1 <i>Material.....</i>	30
2.2 <i>Métodos.....</i>	31
2.2.1 <i>Produto probiótico e placebo.....</i>	31
2.2.2 <i>Estudo em modelo animal.....</i>	32
2.2.3 <i>Administração dos produtos.....</i>	33
2.2.4 <i>Determinação do Coeficiente de Eficácia Alimentar.....</i>	34
2.2.5 <i>Determinação da glicemia de jejum.....</i>	35
2.2.6 <i>Determinação do Índice de Lee.....</i>	35
2.2.7 <i>Coleta de tecidos e órgãos de interesse.....</i>	35
2.2.8 <i>Preparo das lâminas histológicas e análise morfométrica dos adipócitos.....</i>	36
2.2.9 <i>Análise de citocinas.....</i>	36
2.2.10 <i>Determinação da composição da microbiota fecal.....</i>	38
2.2.11 <i>Análise Estatística dos Resultados.....</i>	41
3 Resultados e discussão.....	41
3.1 <i>Controle da viabilidade dos microrganismos presentes no produto fermentado probiótico.....</i>	41
3.2 <i>Variação ponderal.....</i>	43
3.3 <i>Consumo alimentar e hídrico.....</i>	45
3.4 <i>Coeficiente de Eficácia Alimentar.....</i>	46
3.5 <i>Determinação da glicemia de jejum.....</i>	48
3.6 <i>Avaliação do tecido adiposo e fígado.....</i>	50
3.7 <i>Avaliação morfométrica dos adipócitos.....</i>	52
3.8 <i>Análise de citocinas no tecido adiposo.....</i>	56
3.9 <i>Determinação da composição da microbiota fecal.....</i>	60

4 Conclusões.....	65
5 Referências.....	66
Considerações finais.....	80
Referências.....	81
Apêndices.....	89
Anexos.....	92

Introdução

A obesidade é uma doença metabólica de etiologia multifatorial, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal e que está fortemente associada com intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemias e doenças cardiovasculares (1).

O desequilíbrio energético, desencadeado pela oferta excessiva de nutrientes, pode ser regulado pelo tecido adiposo, que atua como um reservatório calórico, e, em condições de déficit de energia promove a lipólise liberando nutrientes para outros tecidos (2).

Estudos indicam que a microbiota intestinal também influencia o metabolismo energético, apresentando efeitos sistêmicos sobre o metabolismo lipídico do hospedeiro. Isso se deve à produção de ácidos graxos de cadeia curta, além de, possuírem a capacidade de extrair energia da dieta, levando ao aumento da adiposidade corporal (3).

O trato gastrointestinal humano é composto por trilhões de microrganismos que possuem influência sobre o metabolismo do hospedeiro e sistema imune, protegendo contra patógenos e mantendo a homeostase energética por interações simbióticas. Dentre as variadas espécies bacterianas, cerca de 90% pertencem aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (4).

Quando há um desequilíbrio na composição da microbiota, verifica-se aumento da permeabilidade intestinal, perda da integridade epitelial e ativação da resposta imune da mucosa o que leva ao desenvolvimento de distúrbios

gastrointestinais como a doença inflamatória intestinal e também a outras comorbidades metabólicas como a obesidade e diabetes melitus tipo 2 (5).

Diferentes fatores ambientais podem interferir na composição da microbiota intestinal, incluindo os padrões alimentares, haja visto que, o consumo de elevados teores de gorduras e açúcares influenciam a abundância relativa de microrganismos do filo *Firmicutes*, e uma alimentação balanceada e de baixas calorias pode aumentar o número de microrganismos pertencentes ao filo *Bacteroidetes*, com impacto no metabolismo do hospedeiro (6-7). Além disso, uma dieta rica em lipídios pode causar uma inflamação crônica de baixo grau a partir do aumento nos níveis de endotoxinas circulantes, como o lipopolisacarídeo (LPS) que, associado ao desequilíbrio da microbiota, favorece o desenvolvimento de doenças metabólicas e o acúmulo de gordura branca visceral (8).

O uso de microrganismos probióticos - microrganismos vivos que conferem um benefício para a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas - pode influenciar a ecologia e o perfil da imunidade microbiana intestinal funcionando no tratamento e prevenção de distúrbios metabólicos (9).

Diferentes cepas de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. apresentam propriedades probióticas, dentre as quais se destacam a melhoria na função da barreira intestinal, aumento da adesão competitiva à mucosa do epitélio e regulação do sistema imune associado ao intestino (10-12).

Inúmeras estratégias alimentares são propostas para redução do peso corporal, no entanto, a alteração da microbiota parece impactar significativamente os efeitos a longo prazo nesta redução (13-14).

Em vista disso, novos estudos que reforcem o papel regulatório e cepa específico dos microrganismos probióticos no combate à obesidade e outras complicações metabólicas fazem-se necessários servindo como alternativas futuras no controle da epidemia da obesidade.

Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por inúmeros microrganismos compreendendo até mil espécies, das quais, aproximadamente 97% são representadas por bactérias anaeróbias estritas e 3% aeróbias/anaeróbias facultativas (15-16).

A população bacteriana é formada pelos gêneros *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* spp., entre outros. Na maioria dos indivíduos há predominância dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, sendo que, as principais integrantes do *Firmicutes* são as classes Bacilli, Clostridia e Mollicutes enquanto o filo *Bacteroidetes* é composto principalmente por *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingobacterias* (17-18).

No entanto, em cada indivíduo a composição da microbiota intestinal é influenciada por diferentes fatores como: genética, modo de nascimento, forma de aleitamento durante a infância, presença de doenças ao longo da vida, uso de medicamentos, idade e alimentação (19).

A colonização intestinal se inicia durante a gravidez e continua após o nascimento até aproximadamente dois anos de idade, quando a microbiota da criança atinge uma composição semelhante à de um adulto (20-21).

A colonização precoce é essencial para a constituição de uma microbiota intestinal saudável. O desequilíbrio desta microbiota caracteriza a disbiose intestinal em que há proliferação de bactérias patogênicas e produção de toxinas e metabólitos, que ao serem absorvidos induzem distúrbios inflamatórios (22).

No momento do parto, quando a criança torna-se exposta à microbiota vaginal materna e demais bactérias fecais e ambientais há uma rápida colonização (23). Inicialmente esta microbiota é composta pelos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., e o aleitamento natural proporciona a predominância destes gêneros em 90%, se comparado aos outros microrganismos (24).

O leite materno constitui uma fonte natural de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e apresenta cerca de 3 a 6g/L de oligossacarídeos que atuam como prebióticos - ingredientes alimentares não digeríveis pelo sistema gastrointestinal humano e que possuem a capacidade de afetar de forma benéfica a saúde do hospedeiro, por estimular a multiplicação ou a atividade de um número limitado de bactérias (25).

Estudos epidemiológicos demonstram que o aleitamento materno reduz a incidência de doenças e agravos à saúde como pneumonia, diarreia e enterocolite necrosante, podendo prevenir quadros de diabetes mellitus tipo I, asma, entre outras doenças que possam vir a se manifestar com o

aumento da faixa etária. Essa proteção conferida pelo leite materno é atribuída, ao menos parcialmente, à modulação da microbiota intestinal (26-27).

A microbiota intestinal contribui para a homeostase do organismo e apresenta funções múltiplas e variadas, destacando-se os mecanismos de defesa contra patógenos e o desenvolvimento e preservação das microvilosidades intestinais, bem como a síntese de algumas vitaminas, como a vitamina B12 e a vitamina K (28-29).

Lactobacillus spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem, durante o processo fermentativo, ácido láctico, peróxido de hidrogênio e ácido acético, favorecendo a acidez do meio intestinal. Além disso, algumas cepas são capazes de produzir bacteriocinas, proteínas metabolicamente ativas, que participam da destruição de microrganismos indesejáveis, prevenindo a proliferação bacteriana ou o dano ao epitélio intestinal (30-32).

Microrganismos intracelulares facultativos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e algumas bactérias Gram-negativas, possuem a capacidade de atravessar a parede intestinal de forma razoavelmente fácil (33). Além disso, diferentes espécies bacterianas presentes na luz do TGI produzem altas concentrações de endotoxinas que podem afetar a saúde intestinal. Dessa forma, a preservação da integridade das células epiteliais e das junções intercelulares da mucosa intestinal é importante para evitar a absorção e disseminação de agentes patogênicos (29).

A composição da microbiota intestinal influencia a digestão e absorção dos nutrientes presentes na dieta, pois muitos componentes

dietéticos que são resistentes à digestão inicial no intestino delgado são, posteriormente, fermentados pela comunidade microbiana do intestino grosso, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são absorvidos através da mucosa do cólon (34).

A microbiota do indivíduo adulto é resiliente, e geralmente permanece estável por longos períodos. Entretanto, está sujeita a mecanismos de seleção positivos ou negativos, determinando o aumento ou a diminuição dos diferentes grupos de bactérias que a compõe. Quando há um desequilíbrio na composição da microbiota (disbiose), verifica-se aumento da permeabilidade intestinal, perda da integridade epitelial e ativação da resposta imune da mucosa, podendo levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de doenças (35).

Os resultados de diferentes trabalhos científicos evidenciam a importância da composição da microbiota intestinal na promoção ou prevenção de diferentes doenças como, doenças inflamatórias intestinais, diarreia causada por antibióticos, hiperlipidemia, diabetes mellitus, obesidade, entre outras (36-38).

Obesidade e microbiota intestinal

A obesidade está associada a vários distúrbios metabólicos que envolvem processos inflamatórios de baixo grau. Evidências apontam diferenças entre a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e portadores de distúrbios metabólicos, como diabetes e obesidade. Estudos indicam que uma dieta rica em gorduras levaria a

inflamações intestinais associadas, principalmente, ao estresse oxidativo, desordem metabólica e na composição da microbiota intestinal (39-41).

A obesidade parece estar associada às mudanças na quantidade relativa de duas divisões bacterianas presentes no intestino - *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. A maioria dos estudos evidencia que animais induzidos à obesidade e indivíduos obesos apresentam maior abundância relativa de *Firmicutes* e menor de *Bacteroidetes*, quando comparados aos grupos eutróficos (42-43).

Foi observado também, que a microbiota predominante no obeso (filo *Firmicutes*) possui maior capacidade de estimular a absorção de energia da dieta. Turnbaugh et al. (44) verificaram que camundongos “*germ free*” colonizados com a microbiota de camundongos obesos, exibiram aumento da gordura corporal total, sem qualquer aumento no consumo alimentar (44).

Os mecanismos de ação envolvidos na relação composição da microbiota intestinal e obesidade ainda não são completamente conhecidos (45), entretanto, algumas hipóteses são propostas (Figura 1).

Uma dieta hiperlipídica altera consideravelmente o perfil da microbiota, podendo provocar um aumento da permeabilidade intestinal e, na dependência de excesso de tecido adiposo, consequências inflamatórias (46). Este estado inflamatório é descrito como endotoxemia metabólica, ocasionado pela translocação bacteriana gastrointestinal, proporcionando o aumento das concentrações plasmáticas de lipopolissacarídeos (LPS) (47).

O LPS é uma endotoxina bacteriana presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (48). O aumento de LPS após uma refeição

rica em lipídios, ativa a via inflamatória, a qual se inicia com a estimulação do *Receptor Toll-Like* do tipo 4 (TLR4) que, por sua vez, conduz à estimulação de fatores de transcrição, como por exemplo, o *Nuclear Factor kappa B* (NF-kB) (49-50). A ativação da via do NF-kB, controla a resposta adaptativa imune por meio da produção de mediadores ou citocinas inflamatórias, tais como, interleucina 1 (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (51). Produtos de genes que são regulados pelo NF-kB – como IL-1 β e TNF- α - também podem estar envolvidos em sua ativação (51-52).

A inflamação pode provocar prejuízo na sinalização da insulina celular, contribuindo com a resistência à insulina e desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Tal alteração no metabolismo passa a ter influência sobre o tecido adiposo, relacionando-a com o desenvolvimento da obesidade (53).

A microbiota intestinal participaria da digestão de polissacarídeos, aumentando a quantidade de glicose no fígado e, conseqüentemente, a lipogênese (54). Da mesma forma, a deposição de gordura no fígado e no músculo também pode ser regulada por certos microrganismos, por alteração dos níveis da Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato (AMPK), enzima que monitora os níveis de energia celular e estimula a oxidação de ácidos graxos em tecidos periféricos (55-57). Há evidências de que a atividade metabólica de alguns microrganismos intestinais facilita a extração e estocagem das calorias ingeridas (58-59).

A microbiota intestinal pode levar a inibição do Fator Adipocitário Induzido pelo Jejum (FIAF) promovendo assim a adiposidade, já que, o FIAF é um inibidor de lipase lipoprotéica (LPL) circulante - enzima que hidrolisa os triglicerídeos presentes em lipoproteínas, liberando ácidos graxos no músculo, coração e tecido adiposo. A inibição do FIAF resultaria em aumento da atividade da LPL e maior acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (60,54).

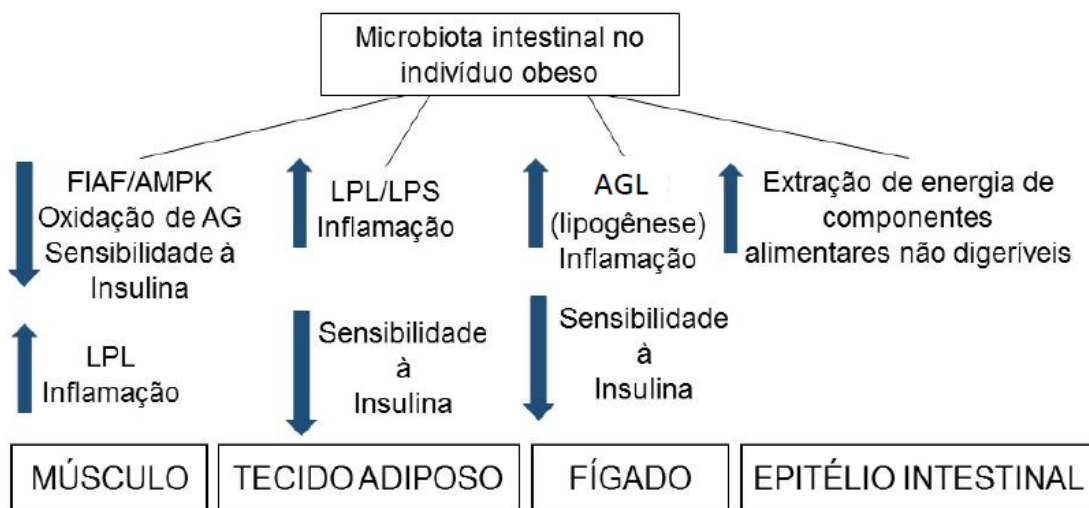


Figura 1. Prováveis interações entre microbiota intestinal e metabolismo intermediário. Adaptada (54). FIAF (Fator Adipocitário Induzido pelo Jejum); AMPK (Adenosina Monofosfato); AG (Ácidos Graxos); LPL (Lipase Lipoprotéica); LPS (Lipopolissacarídeo); AGL (Ácidos Graxos Livres).

Dietas com elevadas proporções de gorduras insaturadas e de fibras alimentares, como a dieta mediterrânea, têm sido associadas à proteção contra doenças crônicas não transmissíveis. Os benefícios da elevada ingestão de gorduras mono e poli-insaturadas, combinados aos efeitos antioxidantes de micronutrientes presentes nos vegetais *in natura*, se refletem em mudanças favoráveis em células de diversos órgãos, reduzindo

sistemicamente o estresse oxidativo e minimizando a deposição de lipoproteínas e o processo aterosclerótico (61-62).

Estudos reforçam que fatores dietéticos específicos, tais como alimentos da dieta mediterrânea, influenciam a composição da microbiota intestinal podendo prevenir e tratar a obesidade. Uma conduta que vem sendo proposta para redução do risco de desenvolver obesidade é garantir uma microbiota equilibrada e um funcionamento intestinal adequado (63). Nesse sentido, a utilização de probióticos surge como uma estratégia de prevenção e tratamento, atuando na modulação da microbiota intestinal de indivíduos obesos (64).

Probióticos e modulação da obesidade

O uso de microrganismos probióticos - microrganismos vivos que conferem um benefício para a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas - pode influenciar a microbiota intestinal e modular o sistema imune, atuando no tratamento e prevenção de distúrbios metabólicos (65).

Os probióticos são indicados para o tratamento de diversas doenças e os gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são os que apresentam os melhores resultados (66-67).

Chen, Wang e Li (68) demonstraram os benefícios da administração de *Bifidobacterium longum* em ratos com peso adequado e induzidos à síndrome metabólica por dieta hiperlipídica. Os pesquisadores verificaram redução no ganho de peso, bem como, diminuição na deposição de gordura.

Os benefícios apresentados podem estar relacionados ao aumento na produção de butirato, AGCC que estimula a liberação do hormônio *glucagon-like peptide* (GLP-1) pelas células intestinais, promovendo a saciedade e maior liberação de insulina para captação de glicose (68).

Moya-Pérez, Neef e Sanz (69), identificaram melhora do perfil metabólico de camundongos que foram submetidos à obesidade por dieta com alto teor de lipídios [60,3% do valor energético total (VET)] combinada à administração do probiótico *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 (1×10^9 UFC). Nesse estudo houve modulação na microbiota intestinal com redução na abundância dos filos *Firmicutes* e *Proteobactérias*, redução das células B no tecido adiposo, dos macrófagos pró-inflamatórios no tecido adiposo e fígado, dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose, além de redução no ganho de peso corporal (69).

Da mesma forma, Aoki et al. (70) estudaram o efeito das cepas *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* GCL2505 (BlaG) e *B. longum* JCM1217 (BloJ) na prevenção da síndrome metabólica em camundongos alimentados por dieta hiperlipídica (DHL) (45% do VET na forma de lipídios). Após duas semanas de indução da obesidade um grupo de animais recebeu 1×10^9 UFC/dia de BlaG e outro grupo 1×10^9 UFC/dia de BloJ, sendo que o tratamento com os probióticos foi mantido por sete semanas. Foi verificada diminuição nos depósitos de gordura visceral e subcutânea e melhora significativa sobre a tolerância à glicose no grupo que recebeu a DHL e o BlaG, no entanto, o tratamento com BloJ não teve esse efeito. Além disso, o tratamento com BlaG revelou maior abundância relativa dos gêneros

Bifidobacterium spp. e *Lactobacillus* spp. sobre a comunidade bacteriana geral da microbiota intestinal, em comparação ao grupo alimentado por DHL e tratado com BloJ (70).

Manzoni et al. (71) investigaram os efeitos de uma bebida de soja, fermentada por *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* (reclassificado como *Lactobacillus helveticus*) e enriquecida com isoflavonas, sobre o tecido adiposo, níveis de glicose e lipídios circulantes no sangue de ratos jovens. Os autores constataram benefícios sobre os depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal, sendo que as circunferências dos adipócitos dos animais do grupo alimentado apenas por dieta hipercolesterolêmica foi significativamente maior quando comparada ao grupo que recebeu a dieta e o produto fermentado. Além disso, verificou-se que o produto probiótico acentuou o efeito antilipogênico das isoflavonas sobre a gordura retroperitoneal (71).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cheik, Rossi e Guerra (72), que verificaram diminuição nos níveis de lipídios circulantes e redução da área dos adipócitos em ratos adultos alimentados com dieta hipercolesterolêmica e a mesma bebida à base de soja, fermentada com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* (72).

Apesar dos resultados positivos encontrados nos estudos anteriores, a relação entre ingestão da referida bebida probiótica à base de soja, alteração da composição da microbiota intestinal e a possível relação com o peso corporal, ainda não foi avaliada e constitui um tema interessante e importante.

Em vista disso, o objetivo geral do presente estudo foi analisar o efeito de um produto à base de extrato aquoso de soja, fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* 416 e com adição de *B. longum* ATCC 15707, sobre a composição da microbiota fecal e a sua relação com a variação de parâmetros inflamatórios e peso corporal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Capítulo 1.

Efeito de uma bebida probiótica à base de soja sobre a composição da microbiota fecal e variação ponderal em camundongos induzidos à obesidade

Efeito de uma bebida probiótica à base de soja sobre a composição da microbiota fecal e variação ponderal de camundongos induzidos à obesidade

Juliana de Carvalho Marchesin¹
Larissa Sbaglia Celiberto¹
Allan Botinhon Orlando¹
Alexandra Ivo de Medeiros¹
Roseli Aparecida Pinto¹
José Antônio Sampaio Zuanon²
Luis Carlos Spolidorio²
Andrey dos Santos³
Maria Pía Taranto⁴
Daniela Cardoso Umbellino Cavallini¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP - Brasil.

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara, SP - Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP - Brasil.

⁴Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA), Argentina.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito de uma bebida probiótica à base de soja (*Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* 416 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) sobre a composição da microbiota fecal e a sua relação com parâmetros inflamatórios e regulação do peso corporal de camundongos induzidos à obesidade. O grupo que recebeu a bebida probiótica apresentou peso médio inferior ao do grupo controle positivo até a 9ª semana do estudo ($p < 0,05$), área e diâmetro dos adipócitos inferiores a de todos os grupos induzidos à obesidade e aumento significativo de IL-6 e IL-10. A ingestão da dieta hiperlipídica resultou em aumento na proporção do gênero *Lactobacillus* spp. (filo *Firmicutes*) e a administração do produto probiótico contribuiu com o equilíbrio da microbiota intestinal ao manter a proporção de microrganismos do filo *Bacteroidetes* e promover um aumento na população de *Bifidobacterium* spp. Nas condições do estudo, a ingestão regular da bebida probiótica foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal, o tamanho dos adipócitos, além de modular o perfil imunológico e a microbiota fecal dos animais, atuando positivamente no controle da obesidade.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Obesidade. Microrganismos probióticos. Citocinas

Abstract

The objective of this work was to investigate the effect of a probiotic drink made from soy (*Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* 416 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) on the composition of fecal microbiota and your relationship with inflammatory and regulation parameters body weight induced obesity mice. The group that received the probiotic drink presented medium weight lower than that of the positive control group until the 9th week of the study ($p < 0.05$), area and diameter of adipocytes below of all induced obesity groups and significant increase of IL-6 and IL-10. The intake of high-fat diet resulted in an increase in the proportion of the genus *Lactobacillus* spp. (phylum *Firmicutes*) and the administration of probiotic product contributed the balance of intestinal microbiota to maintain the proportion of micro-organisms belonging to the phylum Bacteroidetes and promote an increase in population of *Bifidobacterium* spp. Under the conditions of the study, the regular intake of probiotic drink was able to reduce body weight, the size of adipocytes, in addition to modulate immune profile and the fecal microbiota of animals, acting positively in the control of obesity.

Key-words: Gut microbiota. Obesity. Probiotic microorganisms. Cytokines.

5 Referências

1. Volp AC, Alfnas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica – Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. 2008. 52/3:537-549. doi: 10.1590/S0004-27302008000300015.
2. World Health Organization (WHO). Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.
3. Eid H M, Wright ML, Anil Kumar NV, Qawasmeh A, Hassan STS, Mocan A. Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medical Plant and Food Ingredients. *Frontiers Pharmacology*. 2017; 8: 387. doi: 10.3389/fphar.2017.00387.
4. World Health Organization (WHO). World Health Statistics. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 24 de janeiro de 2017.
5. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014; 384: 766-81.
6. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf> Acesso em 03 de julho de 2017.
7. Darvall KA, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. Obesity and thrombosis. *European Journal Vascular Endovascular Surgery*. 2007; 33:223-33. doi: 10.1016/j.ejvs.2006.10.006.
8. Ma Y, Gao M and Liu D. Alternating Diet as a Preventive and Therapeutic Intervention for High Fat Diet-induced Metabolic Disorder. *Scientific Reports*. 2016; 6. doi: 10.1038/srep26325.

9. Sabin MA, Werther GAM, Kiess W. Genetics of obesity and overgrowth syndromes. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011; 25(1):207-20. doi: 10.1016/j.beem.2010.09.010.
10. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Punckov K, Perederiv V, et al. Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BioMed Central Microbiology*. 2017; 17:20. doi: 10.1186/s12866-017-1027-1.
11. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011; 108:4554–61. doi: 10.1073/pnas.1000087107.
12. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology*. 2012; 7(1): 91-109. doi: 10.2217/fmb.11.142.
13. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul D. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19: 305-13. doi: 10.1111/1469-0691.12172.
14. Carlucci C, Petrof EO and Allen-Vercoe E. Fecal Microbiota-based Therapeutics for Recurrent *Clostridium difficile* Infection, Ulcerative Colitis and Obesity. *EBioMedicine*. 2016; 13: 37-45. doi: 10.1016/j.jebiom.2016.09.029.
15. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014; 11(8): 506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
16. Moraes AC, Almeida-Pititto ITSB, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2014; 58(4). doi: 10.1590/0004-2730000002940.
17. Marik PE. Colonic flora, Probiotics, Obesity and Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*. (Lausanne). 2012; 3:87. doi: 10.3389/fendo.2012.00087.
18. Celiberto LS, Bedani R, Dejana NN, Medeiros AI, Zuanon JA, Spolidorio LC, et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. *PloS ONE*. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0175935.

19. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 2016; 65: 330-339. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309990.
20. Brunkwall L and Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia*. 2017; 60: 943-951. doi: 10.1007/s00125-017-4278-3.
21. Aoki R, Kamikado K, Suda W, Takii H, Mikami Y, Suganuma N, et al. A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Scientific Reports*. 2017. doi: 10.1038/srep43522.
22. Manzoni MS, Rossi EA, Carlos IZ, Vendramini RC, Duarte AC, Dâmaso AR. Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition*. 2005; 21(10):1018-24. doi: 10.1016/j.nut.2005.02.007.
23. Cavallini DCU, Suzuki JY, Abdalla DSP, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lipids in Health and Disease*; 2011. doi:10.1186/1476-511X-10-126.
24. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Pei YC, Valdez GF. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research Technology*. 1999; 209: 305-307. doi: 10.1007/s002170050.
25. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos - 3ª.ed.* São Paulo: Livraria Varela. 2007; 1: 536.
26. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR, GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr*. 1993; 123: 1939-1951. doi: 10.1007/s002170050499.
27. Lenquiste AS, Marineli RS, Moraes EA, Dionísio AP, Brito ED, Junior RM. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*. 2015; 77(2): 162-170. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.023.
28. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of

substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001; 21:15-23. doi: 10.1002/jat.727.

29. Damsch S, Eichenbaum G, Tonelli A, Lammens L, Van den Bulck K, Feyen B, et al. Gavage-related reflux in rats: identification, pathogenesis and toxicological implications (review). *Toxicol Pathol*. 2011; 39(2):348-60. doi: 10.1177/0192623310388431.

30. Turner PV, Brabb T, Pekow C and Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Journal American Association Laboratory Animal Science*. 2011; 50(5): 600-613. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/>> Acesso em 10 de março de 2017.

31. Jones CP, Boyd KL and Wallace JM. Evaluation of Mice Undergoing Serial Oral Gavage While Awake or Anesthetized. *Journal American Association Laboratory Animal Science*. 2016; 5(6): 805-810. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5113884/>> Acesso em 7 de fevereiro de 2017.

32. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim*. 1996; 30(4):293-316. doi: 10.1258/002367796780739871.

33. Timon VM, Eisen EJ. Comparisons of ad libitum and restricted feeding of mice selected and unselected for postweaning gain. I. Growth, feed consumption and feed efficiency. Animal Science Department, North Carolina State University, Raleigh Received, 1970. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1212387/pdf/41.pdf>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

34. Chan MY, Zhao Y and Heng CK. Sequential Responses to High-fat and High-calorie Feeding in an Obese Mouse Model. *Obesity*. 2008; 16: 972-978. doi: 10.1038/oby.2008.32.

35. Mang GM, Pradervand S, Du NH, Arpat AB, Preitner F, Wigger L. A Neuron-Specific Deletion of the MicroRNA Processing Enzyme DICER Induces Severe but Transient Obesity in Mice. *PLoS ONE*. 2015; 10(1): e0116760. doi: 10.1371/journal.pone.0116760.

36. Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, et al. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Scientific Reports*. 2014. doi: 10.1038/srep04517.

37. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. 2010; 3: 9-10. doi: 10.1242/dmm.006239.
38. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968;40:527-8. doi: 10.1677/joe.0.0400527.
39. Coradini JG, Karvat J, Brancalhão RMC, Ribeiro LFC, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Características nociceptivas e histomorfológicas de nervos medianos de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico. *Scientia Medica*. 2014; 24(4):368-72.
40. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, and MacDougald OA. Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. *Methods Enzymol*. 2014; 537: 93–122. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9.
41. Silvério R, Lira FS, Oyama LM, Nascimento CMO, Otoch JP, Alcântara PSM, et al. Lipases and lipid droplet-associated protein expression in subcutaneous white adipose tissue of cachectic patients with cancer. *Lipids in Health and Disease*. 2017; 16: 159. doi: 10.1186/s12944-017-0547-x.
42. Jenkins NT, Padilla J, Rector RS and Laughlin MH. Influence of regular physical activity and caloric restriction on β -adrenergic and natriuretic peptide receptor expression in retroperitoneal adipose tissue of OLETF rats. *Exp Physiol*. 2013; 98(11): 10.1113/expphysiol.2013.074658. doi: 10.1113/expphysiol.2013.074658.
43. McGuire VA, Diez TRZ, Emmerich CH, Strickson S, Ritorto MS, Sutavani RV, et al. Dimethyl fumarate blocks proinflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. 2016; 6:31159. doi: 10.1038/srep31159.
44. Kulawik A, Engesser R, Ehlting C, Raue A, Albrecht U, Hahn B, et al. IL-1 β -induced and p38MAPK-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) in hepatocytes: Signal transduction with robust and concentration-independent signal amplification. *The Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292 (15): 6291-02.
45. Darling NJ, Totj R, Arthur JS, Clark K. Inhibition of SIK2 and SIK3 during differentiation enhances the anti-inflammatory phenotype of macrophages. *Biochemical Journal*. 2017; 474 (4):521-537. doi: 10.1042/BCJ20160646.

46. Xu Z, Zhao Y, Zhong P, Wang J, Weng Q, Qian Y, et al. EGFR inhibition attenuates diabetic nephropathy through decreasing ROS and endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget*. 2017; 8(20): 32655-67. doi: 10.18632/oncotarget.15948.
47. Nikolaidis NM, Gray JK, Gurusamy D, Fox W, Stuart WD, Huber N, et al. Ron Receptor Tyrosine Kinase Negatively Regulates TNF α Production in Alveolar Macrophages by Inhibiting NF- κ B Activity and Adam17 production. *Shock*. 2010. 33(2): 197-204. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181ae8155.
48. Liu J, Guan X and Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon- γ -mediated pathways. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(1): 141-152. doi: 10.1084/jem.20061440.
49. Poutahidis T, Kleinewietfeld M, Smilie C, Levkovich T, Perotta A, Bhela S, et al. Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e68596. doi: 10.1371/journal.pone.0068596.
50. Thellin O, EiMoualij B, Heinen E, Zorzi W. A decade of improvements in quantification of gene expression na internal standard selection. *Biotechnology Advances*. 2009; 27(4): 323-333.
51. Ryz NR, Lochner A, Bhullar K, Ma C, Huang T, Bhinder G, et al. Dietary vitamin D3 deficiency alters intestinal mucosal defense and increases susceptibility to *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015; 309(9): G730-742. doi: 10.1152/ajpgi.0006.2015.
52. Barghouthi SA. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian Journal of Microbiology*. 2011; 51(4): 430-444. doi: 10.1007/s12088-011-0122-5.
53. Ryz NR, Lochner A, Bhullar K, Ma C, Huang T, Bhinder G, et al. Dietary vitam D3 deficiency alters intestinal mucosal defense and increases susceptibility to *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015. 309(9): 730-742. doi: 10.1152/ajpgi.00006.2015.
54. Harley ITW, Giles DA, Pfluger PT, Burgess SL, Walters S, Hembree J. Differential colonization with segmented filamentous bacteria and *Lactobacillus murinus* do not drive divergent development od diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Molecular Metabolism*. 2013; 2(3): 171-183. doi: 10.1016/j.molmet.2013.04.004.

55. Pachikian BD, Neyrinck AM, Portois L, Backer FC, Sohet FM, Hacquebard M, et al. Involvement of gut microbial fermentation in the metabolic alterations occurring in n-3 polyunsaturated fatty acids-depleted mice. *Nutrition & Metabolism*. 2011; 8: 44. doi: 10.1186/1743-7075-8-44.
56. Koleva PT, Valcheva RS, Sun X, Gänzle MG and Dieleman LA. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. *British Journal of Nutrition*. 2012; 108: 1633–1643. doi: 10.1017/S0007114511007203.
57. Ignacio A, Fernandes MR, Rodrigues VAA, Groppo FC, Cardoso AL, Avila-Campos MJ. Correlation between body mass index and faecal microbiota from children. 2015; 2(3): 258.e1–258.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.031.
58. Ketabi A, Dieleman LA and Gänzle MG. Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 110: 1297-1306. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04984.x.
59. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity a Research Journal*. 2002; 10(9): 956-63. doi: 10.1038/oby.2002.130.
60. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 03 de março de 2017.
61. Williams LM, Campbell FM, Drew JE, Koch C, Hoggard N, Rees WD, et al. The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. *PLoS One*. 2014; 9. doi: 10.1371/journal.pone.0106159.
62. Bourgeois F, Alexiu A and Lemonnier D. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *British Journal of Nutrition*. 1983; 49: 17–26. doi: 10.1079/BJN19830006.
63. Huang XF, Xin X, McLennan P, Storlien L. Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptina receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2004; 6: 35–44. doi: 10.1111/j.1463-1326.2004.00312.x.

64. Moussavi N, Gavino V & Receveur O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity*. 2008; 16: 7–15. doi: 10.1038/oby.2007.14.
65. Buettner R, Scholmerich J & Bollheimer LC. Highfat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007; 15: 798–808. doi: 10.1038/oby.2007.608.
66. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133: 1081-87. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.026.
67. Noyan-Ashraf MH, Shikatani EA, Schuiki I, Mukovozov I, Wu J, Li RK, et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. *Circulation*. 2013; 127: 74-85. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.091215.
68. Ya-Ni Y, Qiong-Fen Y, Nian F, Xiao-Wei L, Fang-Gen L. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World Journal Gastroenterology*. 2010;16(27): 3394-401. doi: 10.3748/wjg.v16.i27.3394.
69. Hong SM, Chung EC and Cheol-Hyun K. Anti-obesity Effect of Fermented Whey Beverage using Lactic Acid Bacteria in Diet-induced Obese Rats. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2015; 35(5): 653-659. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.5.653.
70. Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnusus* GG improves insulin sensitivity and reduces aiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 431: 258-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.121.
71. Rippe JM and Angelopoulos TJ. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients*. 2016; 8(11): 697. doi: 10.3390/nu8110697.
72. Stelmach-Mardas M, Rodacki T, Dobrowolsa-Iwanek J, Brzozowska A, Walkowiak J, Wojtanowska-Krosniak A, et al. Link between Food Energy Density and Body Weight Changes in Obese Adults. *Nutrients*. 2016; 8(4): 229. doi: 10.3390/nu804229.
73. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & Behavior*. 1976; 17: 461–471. doi: 10.1016/0031-9384(76)90109-8.

74. Rolls BJ, Van Duijvenvoorde PM, Rowe EA. Variety in the diet enhances intake in a meal and contributes to the development of obesity in the rat. *Physiology & Behavior*. 1983; 31: 21–27. doi: 10.1016/0031-9384(83)90091-4.
75. La Fleur SE, Vanderschuren LJMJ, Luijendijk MCM, Kloeze BM, Tiesjema B, Adan RA. A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*. 2007; 31: 1286–1294. doi: 10.1038/sjijo.0803570.
76. Mercer JG, Archer ZA. Putting the diet back into diet-induced obesity: diet-induced hypothalamic gene expression. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 585: 31–37. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.077.
77. la Fleur SE, van Rozen J, Luijendijk MCM, Groeneweg F and Adan RAH. A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. 2010; 34: 537-546. doi: 10.1038/ij.2009.257.
78. Moura AMA. Nutrição de roedores de laboratório: paradigmas e desafios. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais*, São Paulo. 2014; 2 (4); 288-296. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/RESBCAL/issue/view/1569>>. Acesso em: 14 de março de 2017.
79. Forssten SD, Korczyńska MZ, Zwijsen RML, Noordman WH, Madetija M, Ouwehand AC. Changes in satiety hormone concentrations and feed intake in rats in response to lact acid bacteria. *Appetite*. Elsevier. 2013; 71: 16-21. doi: 10.1016/j.appet.2013.06.093.
80. Harada N, Hanaoka R, Horiuchi H, Kitakaze T, Mitani T, Inui H, et al. Castration influences intestinal microflora and induces abdominal obesity in high-fat diet-fed mice. *Scientific Reports*. 2016; 6. doi: 10.1038/srep23001.
81. Brownlow BS, Petro A, Feinglos MN, Surwit RS. The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior*. 1996; 60:37-41. doi: 10.1016/0031-9384(95)02210-4.
82. Feduccia AA, Wang Y, Simms JA, Yi HY, Li R, Bjeldanes L, et al. Locomotor activation by theacrine, a purine alkaloid structurally similar to caffeine: involvement of adenosine and dopamine receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012; 102: 241-48. doi: 10.1016/j.pbb.2012.04.014.
83. Rustenbeck I, Lier-Glaubitz V, Willenborg M, Eggert F, Engelhard U, Jörns A. Effect of chronic coffee consumption on weight gain glycaemia in a

mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*. 2014; 4(6). doi: 10.1038/nutd.2014.19.

84. Park DY, Ahn YT, Park SH, Huh CS, Yoo SR, Yu R, et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS ONE*. Mar 21; 2013;8(3): e59470. doi: 10.1371/journal.pone.0059470.

85. Sinitskaya N, Gourmelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pévet P & Challet E. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clinical Science*. 2007; 113: 417-25. doi: 10.1042/CS20070182.

86. Meissburger B, Ukropec J, Roeder E, Beaton N, Geiger M, Teupser D. Adipogenesis and insulin sensitivity in obesity are regulated by retinoid-related orphan receptor gamma. *EMBO Mol Med*. 2011; 3(11): 637-651. doi: 10.1002/emmm.201100172.

87. Avala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms*. 2010; 3(9-10): 525-534. doi: 10.1242/dmm.006239.

88. Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annual Reviews Physiology*. 2004; 66: 239-74. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.0321002.115105.

89. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, Odamaki T, Takahashi S, Sugahara H, et al. Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* Strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2010. 74(8): 1656-1661. doi: 10.1271/bbb.100267.

90. An HM, Park SY, Lee DK, Kim JR, Cha MK, Lee SW, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*. 2011. doi: 10.1186/1476-511X-10-116.

91. Park JE, Oh SH, Cha YS. *Lactobacillus plantarum* LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2014; 116(1):145-56. doi: 10.1111/jam.12354.

92. Khan M, Joseph F. Adipose Tissue and Adipokines: The Association with and Application of Adipokines in Obesity. *Scientifica*. 2014; 2014: 328592. doi: 10.1155/2014/328592.
93. Savcheniuk OA, Virchenko OV, Falalyeyeva TM, Beregova TV, Babenko LP, Lazarenko LM. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. *The EPMA Journal*. 2014; 5(1):2. doi: 10.1186/1878-5085-5-2.
94. Parimisetty A, Dorsemans AC, Awada R, Ravanan P, Diotel N and Hellencourt CL. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors – an emerging frontier in the neurodegenerative research. *Journal of Neuroinflammation*. 2016; 13: 67. doi: 10.1186/s12974-016005030-x.
95. Castoldi A, Souza CN, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers Immunology*. 2015; 6: 637. doi: 10.3389/fimmu.2015.00637.
96. Apovian CM, Biornia S, Mott M, Meyers MR, Ullor J, Gagua M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2008. 28(9): 1654-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170316.
97. Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lunde GÖ, et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. 2012. doi:10.1136/gutjnl-2011-301689.
98. Oh MH, Collins SL, Sun IH, Tam AJ, Patel CH, Arwood ML, et al. mTORC2 Signaling Selectively Regulates the Generation and Function of Tissue-Resident Peritoneal Macrophages. 2017; 20(10): 2439-54. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.046.
99. Karimi G, Sabran MR, Jamaluddin R, Parvaneh K, Mohtarrudin N, Ahmad Z et al. The anti-obesity effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. *Food & Nutrition Research*. 2015; 59. doi: 10.3402/fnr.v59.29273.
100. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117:175–184.

101. Mauer J, Denson J, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 metabolism and câncer. *Trends in Immunology*. 2015; 36: 92-101. doi: 10.1016/j.it.2014.12.008.
102. Karauti MA, Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Santos GJ, Sponton CHG, Carneiro EM, et al. Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme. *Scientific Reports*. 2017; 7: 46750. doi: 10.1038/srep46750.
103. Xu H. Obesity and metabolic inflammation. *HHS Public Access*. 2013; 10(1-2): 21-25. doi: 10.1016/j.ddmec.2013.03.006.
104. Zhang Y, Shi Li, Mei H, Zhang J, Zhu Y, Han X, and Zhu D. Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & Metabolism*. 2015; 12:21. doi: 10.1186/s12986-015-0016-3
105. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology*. 2005; 98(4):1154-62. doi: 10.1152/jappphysiol.00164.2004.
106. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*. 2010; 53(11): 2431-41. doi: 10.1007/s00125-010-1865-y.
107. Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ruderman NB. Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes*. 2009; 58(9): 1953-60. doi: 10.2337/db08-1293.
108. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. 2006; 55(10): 2688-97. doi: 10.2337/db05-1404.
109. Timper K, Denson JL, Steculorum AM, Heilinger C, Engström-Ruud L, Wunderlich CM, et al. IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling. *Cell Reports*. 2017; 19: 267-280. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.043.
110. Stolarczk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current Opinion in Pharmacology*. 2017; 37: 35-40. doi: 10.1016/j.coph.2017.08.006.

111. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biology*. 2010; 8(8). doi: 10.1371/journal.pbio.1000465.
112. Pascoal LB, Bombassaro B, Ramalho AF, Coope A, Moura RF, Correia-da-Silva F, et al. Resolvin RvD2 reduces hypothalamic inflammation and rescues mice from diet-induced obesity. *Journal Neuroinflammation*. 2017; 24: 5. doi: 10.1186/s12974-016-0777-2.
113. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*. 2010; 53(11): 2431-41. doi: 10.1007/s00125-010-1865-y.
114. Pereira SS, Teixeira L, Aguilár E, Alvarez-Leite JI. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF- β in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition*. 2014. doi: 10.1016/j.nut.2013.11.023.
115. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4): 1162-72. doi: 10.1378/chest.117.4.1162.
116. Zarrati M, Salehi E, Mofid V, Hossein Zadeh-Attar MJ, Nourjelyani K, Bidad K, et al. Relationship between probiotic consumption and IL-10 and IL-17 secreted by PBMCs in overweight and obese people. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2013; 12(4):404-6.
117. Fabersani E, Abejjon-Mukdsi MC, Ross R, Medina R, González S, Gauffin-Cano P. Specific Strains of Lactic Acid Bacteria Differentially Modulate the Profile of Adipokines *In Vitro*. *Frontiers Immunology*. 2017; 8:266.
118. Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NES, Pellacani A, Wiesell P, et al. Transforming Growth Factor- β 1 Inhibition of Macrophage Activation Is Mediated via Smad3. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. doi: 10.1074/jbc.M004536200.
119. Hakansson A and Molin G. Gut Microbiota and Inflammation. *Nutrients*. 2011; 3(6): 637-682. doi: 10.2290/nu3060637.
120. Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, Toole PW. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity. *Gut Microbes*. 2012; 1:3(3) 186-202. doi: 10.4161/gmic.20168.

121. Haque SZ and Haque M. The ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic gastrointestinal microorganisms – an appraisal. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2017; 10:91-103. doi: 10.2147/CEG.S126243.
122. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et. al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*. 2015; 9(1): 1-15. doi: 10.1038/ismej.2014.99.
123. Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, Araújo TG, Carvalho BM, Rocha GZ et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017; 50: 16-25. doi: 10.1016/j.nutbio.2017.08.006.
124. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Microbiology Letters*. 2009; 294(1): 1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.
125. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK and Dumas ME. Impacto of the gut microbiota on inflammation obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. 2016; 8: 42. doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.

Considerações finais

Os dados da literatura evidenciam que os resultados de estudos que avaliaram os efeitos de probióticos na obesidade e em doenças relacionadas são muitas vezes discrepantes. Tais diferenças podem ser explicadas pela estratégia utilizada para a indução da obesidade (que inclui a quantidade e o tipo de gordura e o período de indução), diferenças inerentes ao modelo animal, tempo do protocolo experimental e pelo efeito cepa específico.

Pesquisas adicionais devem ser realizadas a fim de esclarecer a combinação mais eficaz dos microrganismos a serem administrados, a sua dosagem mínima ideal e o mecanismo de ação, que inclui o efeito em marcadores inflamatórios e na microbiota intestinal. Além disso, a avaliação da microbiota por métodos complementares, como sequenciamento, também será importante para a compreensão da relação entre microrganismos presentes no intestino e gênese da obesidade.

Referências

1. Volp AC, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica – Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. 2008. 52/3:537-549.
2. World Health Organization (WHO). Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles. 2014a.
3. _____. World Health Statistics. 2014b. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em 24 de janeiro de 2017.
4. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The Lancet. 2014; 384: 766-81.
5. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf> Acesso em 03 de julho de 2017.
6. Darvall KA, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. Obesity and thrombosis. European Journal Vascular Endovascular Surgery. 2007; 33:223-33.
7. Sabin MA, Werther GAM, Kiess W. Genetics of obesity and overgrowth syndromes. Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011; 25(1):207-20.
8. Caricilli AM, Picardi PK, Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice. PLoS Biology; 2011.
9. Blaut M, Clavel T, Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. Journal of Nutrition. 2007; 137:751S-55S.

10. Dethlefsen L, Relman DA Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 2011; 108:4554–61.
11. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology.* 2012; 7(1):91-109.
12. Santacruz A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17(10):1906-15.
13. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul D. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical bacterial microbiota and obesity. Clinical Microbiology and Infection.* 2013; 19:305-13.
14. Hill, C, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, [S.l.], 2014 Jun; 11(8): 506-14. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.* Disponível em: <<http://www.nature.com/nrgastro/journal/v11/n8/full/nrgastro.2014.66.html>>. Acesso em: 05 de outubro de 2016.
15. Rodríguez MM, Pérez D, Chaves FJ, Esteve E, Marin-Garcia P, Xifra G. et al. Obesity changes the human gut mycobiome. *Scientific Reports.* 2015; 5:14600. doi: 10.1038/srep14600.
16. Selber-Hnatiw S, Rukundo B, Ahmadi M, Akoubi H, Al-Bizri H, Aliu AF, et al. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Frontiers in Microbiology.* 2017; 8: 1265. doi: 10.3389/fmicb.2017.01265.
17. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DL, Yamada T, Mende DR. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346):174-80. doi: 10.1038/nature09944.
18. Lloyd-Price J, Abu-Ali Galeb and Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine.* 2016; 8:51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
19. Subramanian S, Blanton L, Frese SA, Charbonneau M, Mills DA and Gordon JI. Cultivating Healthy Growth and Nutrition through the Gut

Microbiota. Cell. HHS Author Manuscript. 2015; 161(1): 36–48. doi:10.1016/j.cell.2015.03.013.

20. Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brow EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5:427. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.

21. Gomez-Arango LF, Barret HL, McIntyre HD, Callaway LK, Morrison M and Nitert MD. Contributions of the maternal oral and gut microbiome to placental microbial colonization in overweight and obese pregnant women. *Scientific Reports*. 2017. doi: 10.1038/s41598-017-03066-4.

22. Carlucci C, Petrof EO, Allen-Vercoe E. Fecal Microbiota-based Therapeutics for Recurrent *Clostridium difficile* Infection Ulcerative Colitis and Obesity. *EBioMedicine*. 2016; 13: 37-45. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.029.

23. Rutavisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BioMed Central Gastroenterology*. 2016; 16(1):86. doi: 10.1186/s12876-016-0498-0.

24. Castanys-Muñoz E, Martin MJ and Vazquez E. Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Adv Nutr* 2016; 7(2): 323-330. doi: 10.3945/na.115.010694.

25. Ruiz-Moyano S, Totten SM, Garrido DA, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB and Mills DA. Variation in Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-Associated Strains of *Bifidobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013; 79(19): 6040-6049. doi: 10.1128/AEM.01843-13.

26. Walker WA, Iyengar RS. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatric Research*. 2015; 77(1). doi: 10.1038/pr.2014.160.

27. Moya-Pérez AM, Luczynski P, Renes IB, Wang S, Borre Y, Ryan CA. Intervention strategies for cesarean section-induced alterations in the microbiota-gut-brain axis. *Nutrition Reviews*. 2017; 75(4): 225-240. doi: 10.1093/nutrit/nuw069.

28. Degnan PH, Taga ME and Goodman A. Vitamin B12 as a Modulator of Gut Microbial Ecology. *Cell Metabolism Perspective*. 2014. 20 (5): 769-778. doi:10.1016/j.cmet.2014.10.002.

29. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swan J, Thiele I, Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components Europe Journal Nutrition. 2017. doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
30. Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, Hill C and Cotter PD. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? 2016. doi: 10.12688/f1000research.9615.1.
31. Mokoena MP, Mutanda T and Olaniran AO. Perspectives on the probiotic potential of lact acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. Food Nutr Res. 2016; 60. doi: 10.3402/fnr.v60.29630.
32. Sharma C, Sing BP, Thakur N, Gulati S, Gupta S, Mishra SK and Panwar H. Antimicrobial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. 3Biotech. 2017; 7(1): 31. doi: 10.1007/s13205-016-05991-7.
33. Silva MT, Pestana NTS. The *in vivo* extracellular life of facultative intracellular bacterial parasites: Role in pathogenesis. Immunobiology. 2013; 218(3): 325-337. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.011.
34. Herrmann E, Youg W, Rosendale D, Conrad R, Riedel CU and Egert M. Determination of Resistant Starch Assimilating Bacteria in Fecal Samples of Mice by *In vitro* RNA-Based Stable Isotope Probing. Frontiers Microbiology. 2017; 8: 1331. doi: 10.3389/fmicb.2017.01331.
35. Gomes AC, Bueno AA, Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. Nutrition Journal. 2014; 13:60. doi:10.1186/1475-2891-13-60.
36. Cavallini DCU, Abdalla DSP, Vendramini RC, Bedani R, Bondespacho, LQ, Pauly-Silveira ND et al. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. Lipids in Health and Disease; 2009. doi: 10.1186/1476-511X-8-40.
37. Abegunde AT, Muhammad BH and Ali Taussef. Preventive health measures um inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology. 2016; 22(34): 7625-7644. doi: 10.3748/wjg.v22.i34.7625.
38. Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M and Salas-Salvadó J. Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017; 2017: 6723931. doi: 10.1155/2017/6723931.

39. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM. In gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57:1470-81. doi: 10.2337/db07-1403.
40. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM and Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015; 26. doi: 10.3402/mehd.v26.26191.
41. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK and Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. 2016; 8: 42. doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.
42. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul M. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19(4): 305-313. doi: 10.1111/1469-0691.12172.
43. Xiao L, Sonne SB, Feng Q, Chen N, Xia Z, Li Xiaoping, et al. High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *BioMed Central Microbiome*. 2017; 5:43. doi: 10.1186/s40168-017-0258-6.
44. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*; 2006. 444(7122), 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414.
45. Hur KY and Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2015; 39(3): 198-203. doi: 10.4093/dmj.2015.39.3.198.
46. Oriach CS, Robertson RC, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut-brain axis. *Clinical Nutrition Experimental*. 2016; 6: doi: 10.1016/j.vclnex.2016.01.003.
47. Cani PD, Possemiers S, Van de WT, Guiot Y, Everard A, Rottier O. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*; 2009.58(8):1091–1103. doi: 10.1136/gut.2008.165886.
48. Kang C, Wang B, Kaliannan K, Wang X, Lang H, Hui S, et al. Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Dietary Capsaicin against Chronic Low-Grade Inflammation and Associated Obesity Induced by High-Fat Diet. *mBio*. 2017; 8(3). doi: 10.1128/mbio.00470-17.

49. Jiao P, Chen Q, Shah S, Du Jing, Tao Bo, Tzamelis I, et al. Obesity-Related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes. *Diabetes*. 2009; 58(1): 104-115. doi: 10.2337/db07-1344.
50. Guo H, Jin Daozhong and Chen X. Lipocalin 2 is a Regulator Of Macrophage Polarization and NF-kB/STAT3 Pathway Activation. *Mol Endocrinol*. 2014. doi: 10.1210/me.2014-1092.
51. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336(15):1066-71. doi: 10.1056/NEJM199704103361506.
52. Divella R, Luca R, Abbate I, Naglieri E, Daniele A. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *Journal of Cancer*. 2016; 7(15): 2346-2359. doi: 10.7150/jca.16884.
53. Woting A and Blaut M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*. 2016; 8(4): 202. doi: 10.3390/nu8040202.
54. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA and Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *Journal of Obesity*. 2016. doi: 10.1155/2016/7353642.
55. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010; 53(4): 606-613. doi: 10.1007/s00125-010-1662-7.
56. Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, Kang DW, DiBaise JK. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutrition in Clinical Practice*. 2012; 27(2): 201-214. doi: 10.1177/0884533611436116.
57. Sala PC, Assal KA, Machado N. Microbiota intestinal na obesidade. Cap.31. In: *Fisiologia da Nutrição na Saúde e na Doença*. Orgs: Sawaya, AL; Leandro, CG; Waitzberg, D. 1ª edição. São Paulo, Editora Atheneu; 2013. p. 531-546.
58. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Punckov K, Perederiv V, et al. Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BioMed Central Microbiology*. 2017; 17:20. doi: 10.1186/s12866-017-1027-1.
59. Bäcked F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101(44): 15718-23.

60. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008; 83(4): 460-469. doi: 10.4065/83.4.460.

61. Abete I. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011; 21(2): B1-15. doi: 10.1016/j.numecd.2011.05.001.

62. Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, Storia AL, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. 2015. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957.

63. Lopez-Legarrea P, Fuller NR, Zulet MA, Martinez JA, Caterson ID. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut inflammatory state. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2014; 23(3): 360-8. doi: 10.6133/apjcn.2014.23.3.16.

64. Petschow B, Doré J, Heberd P, Dinan T, Reid G, Blaser M. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome the science of translation. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2013. doi: 10.1111/nyas.12303.

65. World Health Organization and Food & Agriculture Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO; Londres, ON, Canada: 2002. [(acesso em 2 Janeiro 2017)]. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

66. Amara AA, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015; 23(2): 107-114. doi: 10.1016/j.jsps.2013.07.001.

67. Hendaus MA, Jomha FA and Ehlal M. Allergic diseases among children: nutritional prevention and intervention. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2016; 12: 361-372. doi: 10.2147/TCRM.S98100.

68. Chen JJ, Wang R, Li X F. *Bifidobacterium longum* supplementation improved high-fat-fed-induced metabolic syndrome and promoted intestinal Reg I gene expression. *Experimental Biology Medicine*. 2011; 236 (7): 823-31. doi: 10.1258/ebm.2011.010399.

69. Moya-Péres A, Neef A and Snaz Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PloS One*. 2015; 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0126976.
70. Aoki R, Kamikado K, Suda W, Takii H, Mikami Y, Suganuma N. A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Scientific Reports*. 2017; 7: 43522. doi: 10.1038/srep43522.
71. Manzoni MS, Rossi EA, Carlos IZ, Vendramini RC, Duarte AC, Dâmaso AR. Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition*. 2005; 21(10):1018-24. doi: 10.1016/j.nut.2005.02.007.
72. Cheik NM, Rossi EA, Guerra RLF. Effects of a ferment soy product on the adipocyte area reduction and dyslipidemia control in hypercholesterolemic adult male rats. *Lipids in Health and Disease*. 2008; 7:50. doi: 10.1186/1476-511X-7-50.