

**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, biólogo 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).

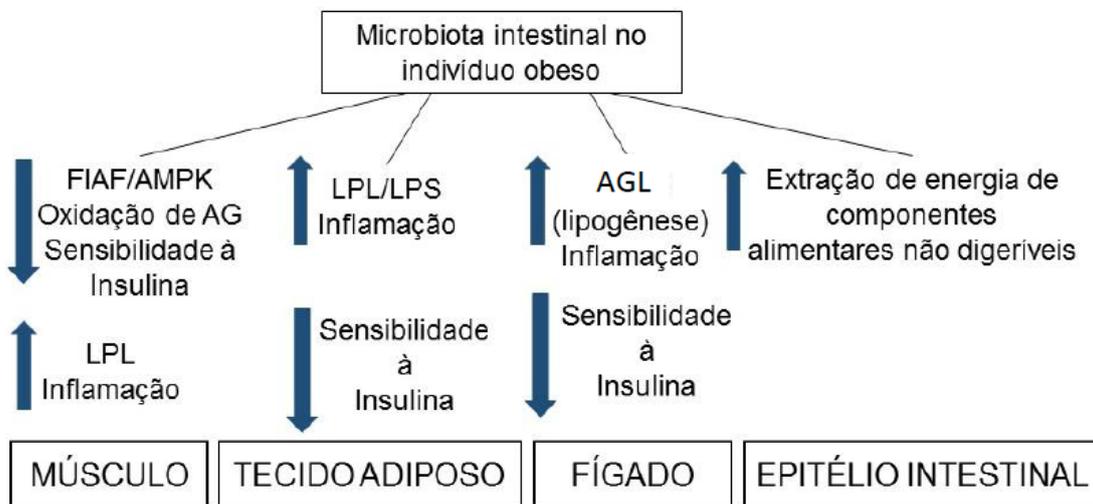


Figura 1. Prováveis interações entre microbiota intestinal e metabolismo intermediário. Adaptada (54). FIAF (Fator Adipocitário Induzido pelo Jejum); AMPK (Adenosina Monofosfato); AG (Ácidos Graxos); LPL (Lipase Lipoprotéica); LPS (Lipopolissacarídeo); AGL (Ácidos Graxos Livres).

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.

1 Introdução

Nas últimas décadas, diferentes estudos apontam mudanças em relação à compreensão dos riscos e gênese de algumas doenças crônicas não transmissíveis. Neste grupo encontram-se, por exemplo, as doenças cardiovasculares, desordens na homeostase da glicose (diabetes mellitus tipo 2 - DM2 e resistência à insulina) e a obesidade. O desenvolvimento de tais doenças relaciona-se, principalmente, com predisposição genética e hábitos e estilo de vida aos quais os indivíduos estão sujeitos. Entretanto, sabe-se que a origem dessas doenças é multifatorial, dificultando o tratamento e causando a elevação nas taxas de morbimortalidade em todo o mundo (1-3).

Dentre essas doenças, a obesidade - acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que causa risco à saúde do indivíduo (4) - tem se destacado, sendo que a prevalência de sobrepeso e obesidade aumenta conforme o nível de renda dos países (5).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de indivíduos acima do peso duplicou em cerca de 30 anos, atingindo em 2014 mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais, dentre esses, 13% eram obesos (11% dos homens e 15% das mulheres) (4).

No Brasil, segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde em 2016, a taxa de mulheres e homens obesos é de 19,6% e 18,1%, respectivamente, representando um aumento de 60% no número de indivíduos obesos em um período de dez anos (6).

O excesso de gordura corporal promove em longo prazo consequências inflamatórias que se associam a muitas desordens metabólicas. Devido à sobrecarga de tecido adiposo, verifica-se maior produção de hormônios, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, que estão relacionadas à gênese de diferentes doenças como: diabetes, hipertensão, doença coronariana, certos tipos de câncer, apneia do sono e osteoartrite (7-8).

A etiologia da obesidade é representada por fatores endógenos e exógenos, os quais podem atuar concomitantemente ou de forma isolada, contribuindo com o aumento da adiposidade corporal e resultando em sérios prejuízos à saúde (9).

A microbiota intestinal se apresenta como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina, pois influencia o armazenamento de gordura e a captação de energia, podendo desencadear uma inflamação sistêmica e distúrbios metabólicos. Esse complexo ecossistema possui grande impacto sobre a função e a saúde do sistema digestório, e sobre a saúde do organismo humano como um todo (10).

Evidências sugerem que indivíduos obesos apresentam uma alteração na composição da microbiota, exibindo maior proporção de microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes* e menor de *Bacteroidetes*. Este desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, conhecido como disbiose, promoveria um aumento na capacidade de absorção de energia a partir da dieta e alteração na resposta imune do indivíduo, levando a um estado de obesidade (11-12). Alguns estudos indicam que alterações na composição dos gêneros de microrganismos que fazem parte da microbiota intestinal, também estariam associadas ao desenvolvimento da obesidade (13-14).

A ingestão de microrganismos probióticos, definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (15), tem sido utilizada como uma estratégia para modular a microbiota e reduzir o risco ou auxiliar no tratamento de diferentes doenças, inclusive da obesidade (16).

Os microrganismos probióticos podem ser veiculados em alimentos industrializados, como leites fermentados e iogurtes, ou serem ingeridos na forma de pó ou cápsulas (17) e apresentam efeito comprovado sobre o equilíbrio da microbiota intestinal, controle do colesterol sanguíneo e de episódios de diarreia, redução do risco de doenças inflamatórias intestinais e de cânceres (18).

Algumas espécies de *Lactobacillus* spp. podem conferir benefícios a humanos e camundongos obesos, demonstrando influência sobre o metabolismo de lipídios e peso corporal. O mesmo efeito foi verificado pela inclusão de *Bifidobacterium* spp. à dieta (19-21).

Estudos anteriores evidenciaram que um produto à base de extrato aquoso de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 apresenta capacidade de modulação do sistema imune e da microbiota intestinal e redução da circunferência dos adipócitos e dos depósitos de gordura corporal (22-23). Entretanto, a relação entre a ingestão do referido produto probiótico, modulação da microbiota e obesidade ainda não foi estudada.

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

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizadas amostras de extrato aquoso de soja fermentado com inóculo misto de *E. faecium* CRL 183 (Centro de Referência para Lactobacilos - CERELA, Tucumán, Argentina) e *L. helveticus* 416 (Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brasil) com adição de *B. longum* ATCC 15707 (*American Type Culture Collection*, EUA; importado por Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Produto probiótico e placebo

Os produtos probiótico e placebo foram processados na Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados de Soja (UniverSoja) do Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), UNESP - Araraquara. O produto fermentado foi obtido segundo a metodologia proposta por Rossi et al. (24), com modificações (18), utilizando como cepas iniciadoras *E. faecium* CRL 183 (probiótico - 1,5% v/v) e *L. helveticus* 416 (coadjuvante tecnológico - 1,5% v/v). A fermentação ocorreu a 37 °C e após o término do processo fermentativo (pH=4,5), foi adicionada a cepa de *B. longum* ATCC 15707 (probiótico), em quantidade suficiente para atingir 8 logUFC.ml⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitro) no produto final. As cepas foram propagadas em meio leite (10% de leite em pó desnatado, 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura), a 37 °C/*overnight*, antes de serem utilizadas no preparo dos produtos.

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) (T7). Para a enumeração de *L. helveticus* 416, *E. faecium* CRL 183 e *B. longum* ATCC 15707 foram utilizados os meios *Lactobacilli Man Rogosa Sharpe Ágar* - MRS (Difco, França), M17 Ágar (Difco, França), e BIM-25 (*Reinforced Clostridium Ágar* - Difco, França - com adição de ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B, sulfato de canamicina, ácido iodoacético e cloreto trifênil tetrazólio), respectivamente. As placas de MRS e M17 foram incubadas em aerobiose, por 48 horas a 37 °C e as placas de BIM-25 foram incubadas em anaerobiose, por 72 horas a 37 °C (25).

O produto placebo (não fermentado) apresentou constituição idêntica ao produto fermentado, sem os cultivos bacterianos (*E. faecium* CRL 183, *L. helveticus* 416 e *B. longum* ATCC 15707). O produto foi acidificado pela adição de ácido láctico de grau alimentício (Purac Sínteses, Brasil), em

quantidade suficiente para alcançar o pH de 4,5, semelhante ao do produto fermentado.

Os produtos foram produzidos semanalmente e armazenados a 5 °C \pm 1 °C até a utilização.

2.2.2 Estudo em modelo animal

No estudo em modelo animal foram utilizados camundongos machos Swiss (Unib: SW) adultos (oito semanas de idade), *Specific Pathogen Free* (SPF), adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) localizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil. Os procedimentos experimentais foram realizados no biotério pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Probióticos II (DAN, FCF, UNESP – Araraquara, Brasil). O protocolo realizado seguiu as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF, UNESP - Araraquara, Brasil sob o protocolo nº 05/2016 (Anexo 1).

Os animais foram alocados em caixas de polipropileno, sob condições ambientais semelhantes, em estante ventilada (Alesco E-520, Brasil), com temperatura ajustada para 22 °C \pm 2 °C e com fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro) (Apêndice 1). O experimento teve duração total de 98 dias (28 dias de adaptação e 70 dias de protocolo). Durante o período de adaptação os animais receberam somente ração padrão, específica para roedores, com composição nutricional segundo especificações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (26) (Valor Energético Total - VET: 3,6 Kcal/g; proteína: 26% Kcal do VET; lipídio: 11% Kcal do VET; carboidrato: 63% Kcal do VET - Presence[®]- Labina) e água *ad libitum* esterilizadas (121 °C / 15 minutos). Após esse período, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10) (Tabela 1). O grupo controle não obeso (C) continuou a receber a ração comercial *ad libitum*, enquanto os grupos OB, OBF e OBP passaram a receber dieta hiperlipídica (DHL).

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais.

Grupo	Estratégia
C	Grupo controle negativo, composto por animais saudáveis alimentados com Dieta Padrão (DP).
OB	Grupo controle positivo, composto por animais que receberam a DHL.
OBF	Grupo fermentado probiótico, composto por animais que receberam a DHL e o produto fermentado probiótico.
OBP	Grupo placebo, composto por animais que receberam a DHL e o produto placebo.

A DHL (VET: 5,15 Kcal/g; 18,63% de proteínas = 14,48% Kcal VET; 34,9% de lipídios = 61,01% Kcal VET e 31,55% de carboidratos = 24,51% Kcal VET) foi adquirida do laboratório Prag Soluções Biotecnológicas® (São Paulo, Brasil) (Anexo 2). A composição da dieta foi adaptada da proposta por Lenquist, Marineli, Moraes, et al. (27), levando-se em consideração o que é preconizado pelo AIN-93M (26). Acrescentou-se gordura animal à dieta em substituição a alguns ingredientes, com o objetivo de aumentar o teor calórico da dieta e induzir o ganho de peso nos animais.

A oferta de ração hiperlipídica aos animais também foi *ad libitum* durante os 70 dias do protocolo experimental e a sua conservação foi feita em embalagens plásticas de polietileno, protegidas da luz e armazenadas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A ingestão hídrica e de ração foi avaliada diariamente e o peso corporal aferido antes do início do tratamento e semanalmente até a eutanásia dos animais.

2.2.3 Administração dos produtos

O produto fermentado probiótico e o produto placebo foram administrados diariamente, por gavagem, no período da manhã, utilizando-se agulha de aço inoxidável para camundongos (Apêndice 2). A dose

administrada correspondeu a 1% do peso corporal, a fim de respeitar a anatomia e capacidade gástrica dos animais e garantir a ingestão de pelo menos $8,0 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ dos microrganismos probióticos (grupo OBF) (28-31).

A administração dos produtos fermentado e placebo (grupos OBF e OBP, respectivamente) foi realizada concomitantemente à ingestão da dieta indutora da obesidade (Figura 1). Os animais dos grupos controle negativo (C) e controle positivo (OB), que não tiveram acesso aos produtos probiótico ou placebo, receberam diariamente, por gavagem, a mesma quantidade de água esterilizada.

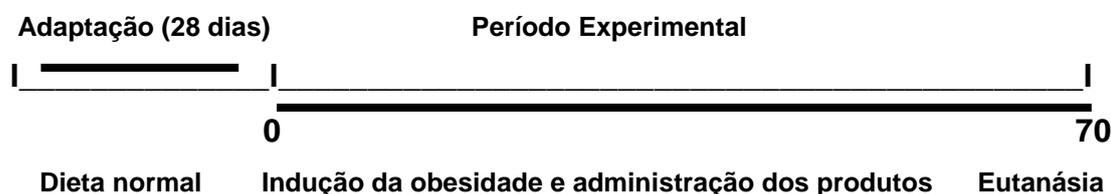


Figura 1. Esquema do protocolo experimental (tempo em dias).

No 70º dia do período experimental os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e os órgãos e tecidos de interesse foram removidos para análise posterior (fígado, depósitos de gordura branca intra-abdominal epididimal e retroperitoneal) (32).

2.2.4 Determinação do Coeficiente de Eficácia Alimentar

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA), calculado pela razão entre o ganho de peso e a quantidade de ração consumida, foi utilizado para determinar a Eficiência Alimentar (EA) das dietas (33).

$$\text{CEA} = (\text{PF} - \text{PI}) / \text{TA} \quad (33-36)$$

Onde:

PF: peso corporal final (g) do animal (término do experimento)

PI: peso corporal inicial (g) do animal

TA: quantidade total de alimento (ração) ingerido no período experimental (g)

2.2.5 Determinação da glicemia de jejum

Na 9ª semana de experimento, foi realizado o teste de glicemia de jejum respeitando-se um período de jejum de seis horas. O teste foi realizado por leitura direta em glicosímetro portátil (*G-tech Free Sistema NoCode*, Republic of Korea) de 0,9 µL de sangue da veia caudal dos camundongos, sendo realizadas duas aferições, com um intervalo de quatro dias entre elas (37).

2.2.6 Determinação do Índice de Lee

O Índice de Lee, utilizado como marcador preditivo para avaliação da obesidade em camundongos foi calculado ao final do experimento, a partir da relação entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento nasoanal (CNA - cm) de cada animal, multiplicado por 1000 (38-39).

$$\frac{\sqrt[3]{\text{Peso (g)}}}{\text{CNA (cm)}} \times 1000 \quad (39)$$

2.2.7 Coleta de tecidos e órgãos de interesse

Após a eutanásia, foi realizada laparotomia para remoção dos órgãos e tecidos de interesse. As deposições de tecido adiposo intra-abdominal que incluem gordura epididimal e retroperitoneal foram observadas *in situ* e, em seguida, removidas e coletadas com auxílio de pinça cirúrgica. Posteriormente, dissecou-se o fígado dos animais. As amostras coletadas foram pesadas (balança semi-analítica SHIMADZU, BL 3200H) e adequadamente processadas e/ou armazenadas para análises histológicas (gordura epididimal) e imunológicas (gordura retroperitoneal).

2.2.8 Preparo das lâminas histológicas e análise morfométrica dos adipócitos

As amostras de gordura epididimal foram imediatamente fixadas por imersão em formaldeído a 10%, por no mínimo 24h. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em álcool e xilol, incluídas em parafina e cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (H&E) (40-41).

O preparo das lâminas histológicas foi realizado em parceria com o laboratório de Patologia (Departamento de Fisiologia e Patologia) da Faculdade de Odontologia (UNESP), Araraquara, Brasil, por um especialista que estava cego ao estudo.

As células adiposas foram observadas por meio de um microscópio óptico (Olympus BX51 - Olympus Optical, Tokyo Japan) acoplado a uma câmera CCD-Iris (Tokyo Japan - Olympus) e sistema analisador de imagens (*software UTHSCSA Image Tool 3.0[®], The University of Texas Health Science Center*), utilizado para determinar a área e diâmetro das células adiposas. Para a determinação da área e diâmetro dos adipócitos foram avaliadas 200 células por grupo experimental.

2.2.9 Análise de citocinas

Para a análise do perfil de citocinas, amostras de tecido adiposo branco intra-abdominal retroperitoneal foram acondicionadas em tubos *ependorf* de dois mililitros contendo solução para conservação do RNA: 350 µL de tampão de lise (*RA1 - kit RNAspin Mini – GE Healthcare, UK*) e 3,5 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) (Sigma, St. Louis, USA) e congeladas a -80 °C (ultrafreezer IULT 335D, Brasil). Posteriormente, realizou-se a extração de RNA total (*kit RNAspin Mini – GE Healthcare, UK*) do tecido adiposo branco de cada um dos 40 animais. A concentração e a pureza das amostras de RNAm obtidas foram confirmadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro de microplacas *Epoch[™]* (BioTek, Winooski, EUA) conectado ao *software Gen 5* (BioTek[™]) pela proporção de 260/280nm

($A_{260/280}$ 1,8-2,2). A síntese de DNAs complementares (cDNAs) foi realizada pela reação da transcriptase reversa (kit *iScript cDNA* – BioRad, USA).

Para cada camundongo, a expressão de RNAm de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi determinada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). A especificidade foi confirmada pela curva de dissociação. Cada reação de qPCR foi realizada em duplicata, e a expressão foi determinada como o valor médio das duas réplicas em relação ao gene endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) Tabela 2.

Os *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β e TNF- α) foram discriminados na Tabela 2. As condições da reação foram 50 °C durante dois minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. As análises das curvas de *melting* foram realizadas em rampa de aquecimento de 65 °C a 95 °C. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad) conectado ao *software CFX Manager 3.1* (BioRad).

Para o cálculo da quantificação relativa das amostras estudadas, utilizou-se o método comparativo $2^{-\Delta Cq}$. A média do ciclo de quantificação (Cq) do gene de interesse foi subtraída da média do Cq do endógeno (GAPDH), resultando em um ΔCq . Para o cálculo da expressão o valor de ΔCq obtido foi adicionado à fórmula $2^{-\Delta Cq}$ (42).

As análises foram realizadas em parceria com o laboratório de Imunologia (Departamento de Ciências Biológicas) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), Araraquara, Brasil, por um especialista que estava cego ao estudo.

Tabela 2. Proteínas sinalizadoras do processo inflamatório (IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β , TNF- α e GAPDH) e respectivos *primers*.

Proteína	Sequência do Primer	Referência
IL-6	F: 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3' R: 5'-AGGTCTGTTGGGAGTGGTATC-3'	(43)
IL-1 β	F: 5'-CATCCAGCTTCAAATCTCGC-3' R: 5'-CACACACCAGCAGGTTATCATC-3'	(44)
IL-10	F: 5'-CCCTTTGCTATGGTGTCTTTC-3' R: 5'-GATCTCCCTGGTTTCTCTTCCC-3'	(45)
TGF- β	F: 5'-TGACGTCCTGGAGTTGTACGG-3' R: 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'	(46)
TNF- α	F: 5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3' R: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'	(47)
GAPDH	F: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' R: 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	(48)

F, *Forward*; R, *Reverse*.

2.2.10 Determinação da composição da microbiota fecal

Fezes frescas dos camundongos (dois *pellets* por animal) foram coletadas no início do experimento (T0) e após a eutanásia e dissecação (T70) (fezes contidas na porção terminal do cólon). As amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis e imediatamente congeladas a -80 °C (ultrafreezer IULT 335D, Brasil) para posterior análise da composição da microbiota fecal por qPCR.

O DNA foi extraído das fezes dos camundongos de cada grupo (C, OB, OBF e OBP) usando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante (49). A concentração e a pureza das amostras de DNA foram confirmadas por espectrofotometria usando o

espectrofotômetro de microplacas *Epoch*TM (BioTek, Winooski, EUA) conectado ao *software Gen 5* (BioTekTM). A pureza foi avaliada pela proporção de 260/280nm ($A_{260/280}$ 1,8-2,2).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada no equipamento *Quant Studio*TM *6 Flex System* da *Applied Biosystems*TM (*Life Technologies*) usando *SYBR-Green PCR Master Mix* (Sigma-Aldrich).

O DNA total extraído foi normalizado à concentração de 2 ng/ μ L e utilizado na amplificação da região do gene RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) pela qPCR. O volume total de reação foi de 20 μ L, sendo 5 μ L de amostra de DNA, 10 μ L de SYBR-Green, 0,6 μ L do *primer forward*, 0,6 μ L do *primer reverse* e 3,8 μ L de água estéril e apirogênica (Farmace). Conforme descrito na Tabela 3, foram utilizados *primers* e condições específicas para cada gênero investigado. O *primer* universal de Eubacteria foi utilizado para determinar o total de 16S rRNA bacteriano em cada amostra, sendo a abundância relativa dos gêneros avaliados estabelecida pelo valor do ciclo de quantificação (Cq) médio de cada gênero em relação ao valor do Cq para bactérias totais (método limiar comparativo $2^{-\Delta Cq}$) (50-52). A especificidade da reação foi confirmada pela curva de dissociação e as análises foram realizadas em duplicata.

Tabela 3. *Primers* específicos para os gêneros de bactérias analisados na microbiota fecal dos camundongos experimentais por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

Gênero	Primer	Condições da PCR*, desnaturação/anelamento/extensão	Referência
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: 5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3' R: 5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'	94 °C, 30 s/62 °C, 30 s/72 °C, 45 s	(53)
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	94 °C , 30 s/56 °C, 30 s/72 °C, 45 s	(54)
<i>Bacteroides</i> spp.	F: 5'-GAGAGGAAGGTCCCCCAC-3' R: 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3'	94 °C, 30 s/60 °C, 30 s/72 °C, 45 s	(55)
<i>Clostridium</i> spp.	F: 5'-ATGCAAGTCGAGCGAKG-3' R: 5'-TATGCGGTATTAATCTYCCTTT-3'	94 °C, 30 s/55 °C, 30 s/72 °C, 45 s	(56, 57)
Eubacteria (<i>primer universal</i>)	F: 5'-TATGCGGTATTAATCTYCCTTT-3' R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'	94 °C, 30 s/63 °C, 30 s/72 °C, 45 s	(58)

F, *Forward*; R, *Reverse*.

Todas as análises de PCR contaram com uma etapa inicial de desnaturação por 3-5min a 95 °C.

2.11 Análise Estatística dos Resultados

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Tukey* e os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de *Komolgorov-Smirnov e Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn*. Adotou-se o nível de significância de 5%.

3 Resultados e discussão

3.1 Controle da viabilidade dos microrganismos presentes no produto fermentado probiótico

Os microrganismos probióticos conferem muitos benefícios à saúde humana. Além de contribuírem para o bom funcionamento intestinal, modulando a comunidade bacteriana do hospedeiro, eles podem ter influência sobre o apetite, a ingestão alimentar, o peso corporal e as funções metabólicas das vias gastrintestinais, auxiliando na prevenção da obesidade (59).

No presente estudo, a população média de células viáveis dos microrganismos probióticos utilizados na obtenção do produto funcional (*E. faecium* CRL 183 e *B. longum* ATCC 15707) permaneceu entre 8,63 e 8,85 logUFC.mL⁻¹, durante todo o protocolo experimental (Figura 2).

De acordo com as recomendações da *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) (15) e da legislação brasileira (ANVISA) (60), alimentos com propriedades funcionais e/ou de saúde devem apresentar uma concentração mínima de microrganismos, estabelecida pela empresa fabricante, e que seja suficiente para “exercer a propriedade funcional no final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição”. Em outras palavras, os valores de células viáveis no produto probiótico não são especificados e o efeito benéfico deve ser comprovado através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

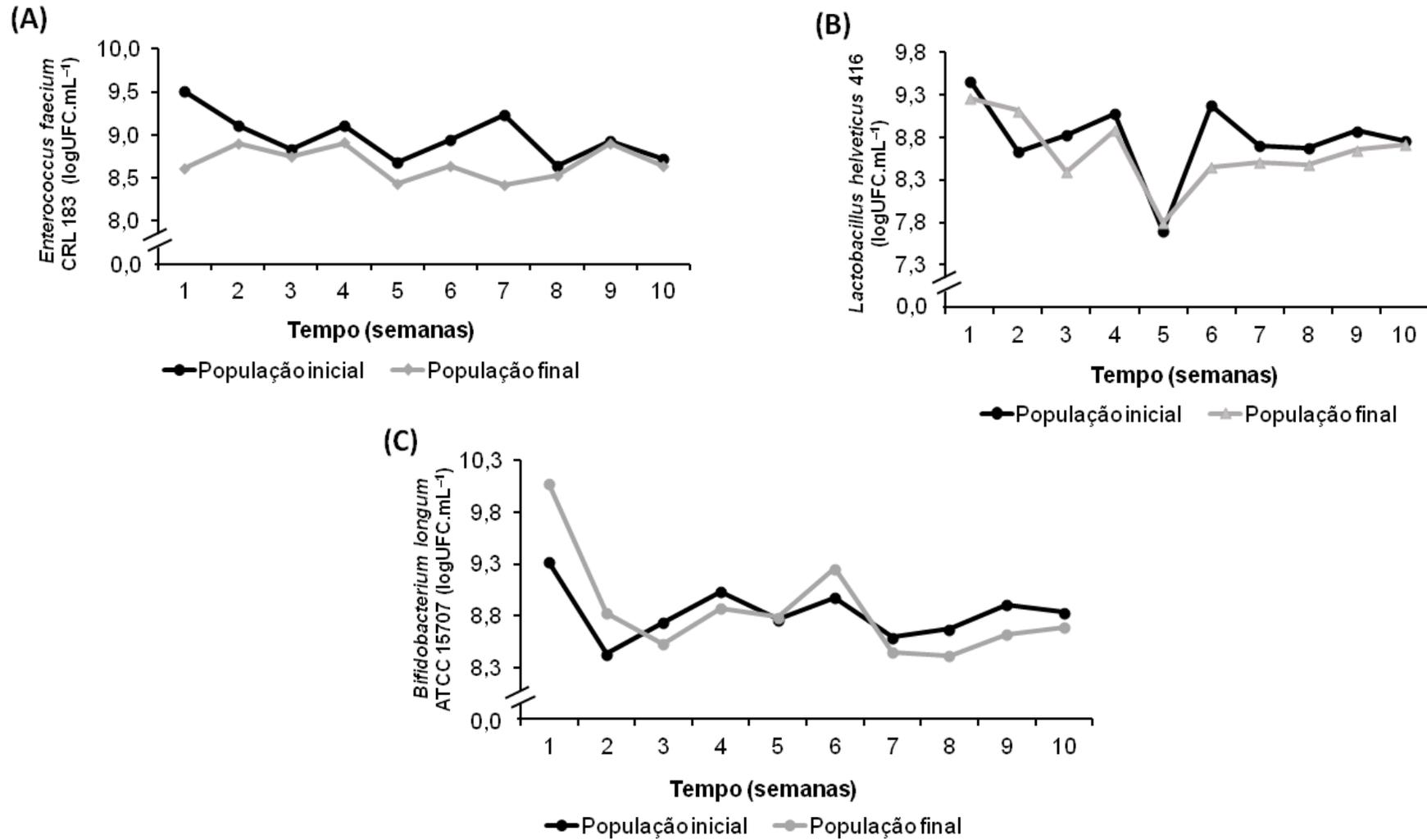


Figura 2. População de células viáveis de *Enterococcus* spp. (*E. faecium* CRL 183), *Lactobacillus* spp. (*L. helveticus* 416) e *Bifidobacterium* spp. (*B. longum* ATCC 15707) dos diferentes produtos produzidos ao longo do período experimental e expressas em logUFC.mL⁻¹. População inicial = produto recém processado; População final = após sete dias de armazenamento em refrigeração.

3.2 Variação ponderal

A Figura 3 indica a variação ponderal dos animais dos diferentes grupos ao longo do protocolo experimental. A avaliação semanal indicou contínuo aumento no peso corporal dos animais, sendo o peso médio do grupo OB considerado estatisticamente diferente do grupo C a partir da 2ª semana ($p<0,01$). Por outro lado, os pesos dos animais dos grupos OBP e OBF diferiram estatisticamente do grupo C a partir da 5ª e 8ª semana de tratamento, respectivamente ($p<0,05$). Destaca-se que os animais que receberam o produto probiótico (grupo OBF) exibiram ganho de peso médio inferior ao grupo obeso (OB) até a 9ª semana do estudo ($p<0,05$).

O grupo que ingeriu o produto placebo (OBP) apresentou ganho de peso médio semelhante ao fermentado (OBF), porém não diferiu do obeso (OB) entre a 4ª e 10ª semana ($p<0,05$).

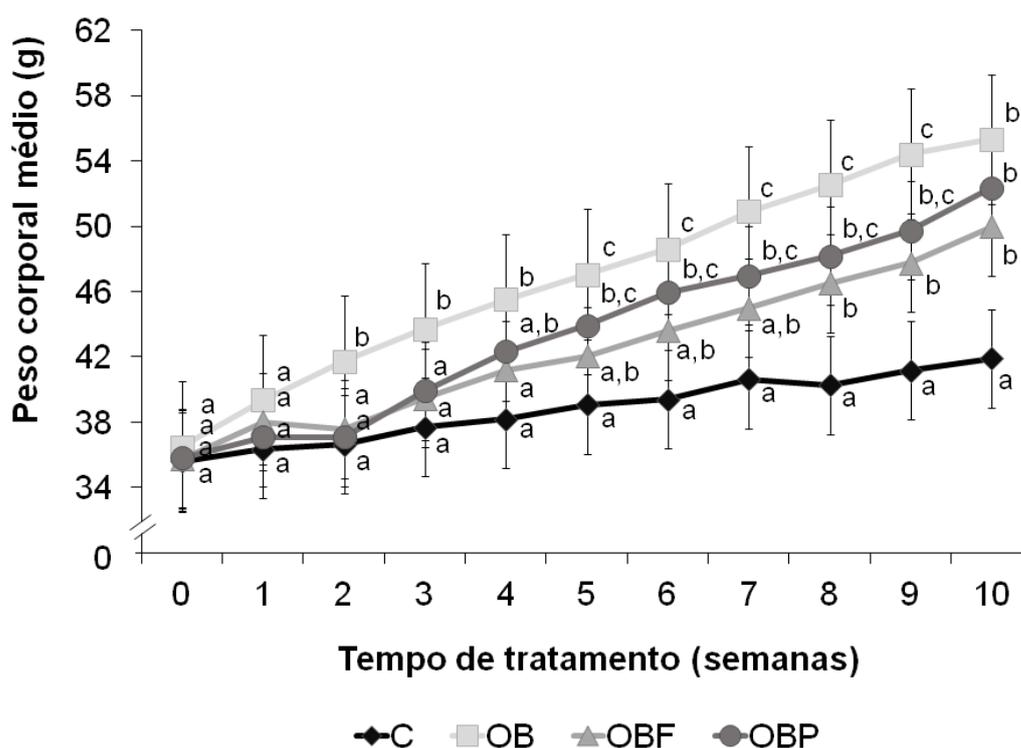


Figura 3. Evolução semanal do peso corporal (g) dos animais dos grupos C, OB, OBF, OBP (Média \pm DP).

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo.

Letras diferentes entre grupos, no mesmo tempo de análise, indicam diferença estatisticamente significativa pela ANOVA e pós-teste de *Tukey* ($p<0,05$).

Willians et al. (60) observaram aumento significativo no peso corporal e adiposidade de camundongos C57Bl/6, após três dias de administração da dieta hiperlipídica (60% da energia proveniente da gordura e 5,2 Kcal/g), sendo que, o aumento permaneceu linear com o passar do tempo em comparação aos animais alimentados por dieta com menor percentual de gordura (10% da energia proveniente da gordura e 3,8 Kcal/g) (60).

De modo geral, a proporção de lipídios provinda de dietas para indução da obesidade em ratos e camundongos varia de 30 a 78% do VET. Este percentual energético é conferido pelo acréscimo de gordura (saturada ou insaturada) ou pela adição de alimentos com alto teor de lipídios (dieta de cafeteria) (62-63). O tipo de gordura presente na dieta também é considerado uma variável importante para o estudo da obesidade. Pesquisas indicam que dietas ricas em ácidos graxos saturados causam maior acúmulo de gordura e/ou maior ganho ponderal (62,64). Buettner et al. (65) concluíram que um teor de gordura superior a 40% do VET, na forma de lipídio de origem animal ou óleo vegetal (fonte de ω -6/ ω -9) levam à obesidade e resistência à insulina (65).

No presente estudo, o percentual energético proveniente da fração lipídica da ração, a maioria na forma de ácidos graxos saturados (banha de porco), correspondeu a 61,01%. O conteúdo energético foi suficiente para proporcionar a elevação no peso dos animais até atingirem o grau de obesidade grave (aumento em 40% no peso corporal comparado ao grupo controle) (66-67). Deve-se ressaltar que foi utilizada uma ração com VET proveniente de lipídios acima da média encontrada na literatura (64), e isso pode ter influenciado a magnitude dos resultados obtidos.

Ya-Ni, et al. (68) verificaram que a utilização de microrganismos probióticos para o tratamento da obesidade possui relação cepa dependente. Os autores avaliaram o efeito da ingestão de quatro cepas de *Bifidobacterium* spp. (L66-5, L75-4, M13-4 e FS31-12) no ganho de peso de ratos alimentados por dieta hiperlipídica (16,52% de proteína; 25,17% de gordura e 56,66% de carboidrato), durante seis semanas. Os animais que receberam as cepas M13-4 e L66-5 apresentaram elevação e redução

significativa no ganho de peso, respectivamente, em comparação com o grupo controle obeso. As outras duas cepas avaliadas não exibiram variação ponderal em relação ao controle ($p < 0,05$) (68).

A fim de avaliar a atividade anti-obesidade de uma bebida fermentada por *Lactobacillus plantarum* e produzida com concentrado proteico do soro do leite, Hong, Chung e Cheol-Hyun (69) submeteram ratos *Sprague-Dawley* à alimentação com alto teor de lipídios (60,3% do VET). Após quatro semanas constatou-se que a suplementação com a bebida fermentada impediu o ganho de peso e o acúmulo de gordura corporal, sendo estes resultados significativamente semelhantes aos obtidos pelo grupo controle, alimentado por dieta normolipídica. Além disso, houve redução nos níveis de lipídios séricos, regulação dos hormônios relacionados ao apetite e melhora da sensibilidade à insulina, quando comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica (69).

Da mesma forma, Kim et al. (70) constataram que a ingestão diária do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG reduz o peso corporal, melhora a sensibilidade à insulina e diminui o acúmulo de lipídios em ratos induzidos à obesidade por meio de dieta hiperlipídica (70).

3.3 Consumo alimentar e hídrico

O consumo excessivo de alimentos com alto teor energético, ricos em gorduras saturadas e açúcares, associado à falta de atividade física são as principais causas da obesidade no mundo (71-72).

Diferentes experimentos com roedores constataram que a oferta de alimentos palatáveis com associação de altos teores de gordura e açúcar e nutricionalmente completos induz ao aumento do consumo alimentar (hiperfagia) e ao ganho excessivo de peso corporal (73-75).

Entretanto, outros estudos mostraram que animais expostos a uma dieta com altos níveis de gordura ou de energia, podem reduzir o consumo alimentar como uma forma de compensar a ingestão energética (76-77).

No presente estudo, o grupo que recebeu a dieta comercial padrão (grupo C) exibiu um consumo diário de ração significativamente superior ao dos grupos alimentados por dieta hiperlipídica (OB, OBF, OBP) ($p < 0,01$). Enquanto o grupo de animais que recebeu o produto probiótico concomitantemente à dieta hiperlipídica (OBF), apresentou consumo alimentar médio diário significativamente menor em relação aos grupos OB ($p = 0,04$) e OBP ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo alimentar e hídrico diário (média \pm DP) dos animais dos grupos C, OB, OBF e OBP, durante o protocolo experimental.

Grupo	Consumo alimentar diário (g)	Consumo hídrico diário (g)
C	6,30 \pm 0,74 ^c	12,16 \pm 3,43 ^{a,b}
OB	4,64 \pm 0,83 ^b	12,63 \pm 3,54 ^b
OBF	3,98 \pm 0,52 ^a	8,51 \pm 1,79 ^a
OBP	4,92 \pm 0,47 ^b	8,94 \pm 3,29 ^{a,b}

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam valores estatisticamente diferentes pela ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A redução na ingestão alimentar observada nos grupos OB, OBF e OBP deve-se provavelmente, a um mecanismo compensatório para manter o equilíbrio energético, pois a dieta hiperlipídica apresentava alto teor calórico (5,15 Kcal/g), comparado à dieta padrão (3,6 Kcal/g) (59-78).

Forssten et al. (79) investigaram a relação entre ingestão de leites fermentados com diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., produção de hormônios da saciedade e ingestão alimentar em ratos *Wistar*. Os autores constataram que houve consumo significativamente menor de ração e modificação na produção de hormônios de saciedade, sendo esse efeito dependente da cepa avaliada (79).

3.4 Coeficiente de Eficácia Alimentar

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) foi utilizado para avaliar a habilidade do animal em converter cada grama de dieta consumida em peso

corporal (33). No presente estudo, os grupos que ingeriram a dieta hiperlipídica (OB, OBF e OBP) apresentaram CEA superior ao do controle alimentado com dieta padrão ($p < 0,05$) (Figura 4).

Embora os animais induzidos à obesidade tenham consumido menor quantidade de ração durante o protocolo experimental, estes apresentaram maior ganho de peso corporal (g), sugerindo que a oferta energética elevada, especialmente na forma de lipídios, contribuiu para o acúmulo de tecido adiposo, demonstrando que o desenvolvimento da obesidade dos animais alimentados por DHL foi ocasionado pela elevação da eficiência alimentar, e não por hiperfagia (80).

O aumento do CEA devido ao ganho de peso está relacionado não só a uma alta ingestão energética, mas também a uma diminuição no gasto de energia devido à temperatura e/ou locomoção, uma vez que, estudos identificaram uma relação inversa entre o ganho de peso e a redução da atividade locomotora (81-83).

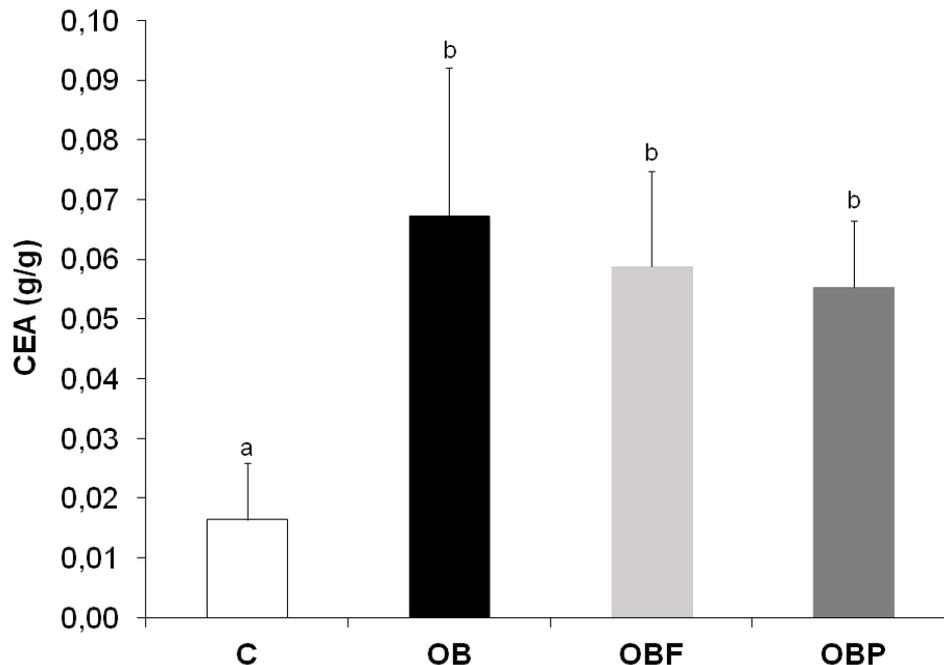


Figura 4. CEA dos diferentes grupos em estudo.

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo. Médias com letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste *Dunn*.

Park et al. (84) ao estudarem os efeitos de uma dieta hiperlipídica associada à ingestão de probióticos - *Lactobacillus curvatus* HY7601 e *Lactobacillus plantarum* KY1032 - em camundongos C57Bl/6J, constataram que o consumo de ração no grupo probiótico foi 7 - 8% inferior ao do grupo placebo, porém essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$). Além disso, os animais que receberam apenas a dieta rica em gordura obtiveram CEA superior aos dos animais alimentados com dieta normal e o grupo que recebeu o probiótico exibiu CEA 29% inferior ao grupo placebo, refletindo menor ganho de peso por gramas de ração consumida (84).

3.5 Determinação da glicemia de jejum

A obesidade está fortemente relacionada à resistência à insulina, que é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. O grau de resistência à insulina, no entanto, pode variar devido à plasticidade do tecido adiposo. O aumento da massa de tecido adiposo, em obesos, deve-se ao aumento no tamanho (hipertrofia) e no número de adipócitos (hiperplasia). Quando em desequilíbrio, as células hipertróficas são resistentes à insulina e mudam o perfil secretor para adipócitos pró-inflamatórios. Por outro lado, quando o equilíbrio é restabelecido para a hiperplasia, verifica-se a associação de pequenos adipócitos funcionais na manutenção da sensibilidade à insulina e melhora das consequências metabólicas da obesidade (66, 85-86).

A análise de glicemia de jejum foi verificada após jejum de seis horas realizado entre sete horas da manhã e 13 horas da tarde, uma vez que o jejum realizado durante a noite resulta em redução intensa do glicogênio hepático no camundongo. O jejum de cinco a seis horas é suficiente para avaliar a ação da insulina dentro de um contexto fisiológico e impõe menos estresse metabólico (87-88).

O grupo controle não obeso (C) apresentou a menor média de glicemia de jejum ao término do experimento ($163,5 \pm 24,3 \text{ mg.dL}^{-1}$), diferindo significativamente dos demais grupos ($p < 0,05$). Entre os grupos

induzidos à obesidade, o OBF exibiu o menor valor de glicemia de jejum ($258,6 \pm 20,7 \text{ mg.dL}^{-1}$), porém sem apresentar diferença significativa em relação aos grupos OB ($287,5 \pm 66,3 \text{ mg.dL}^{-1}$) e OBP ($308,9 \pm 39,7 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 5).

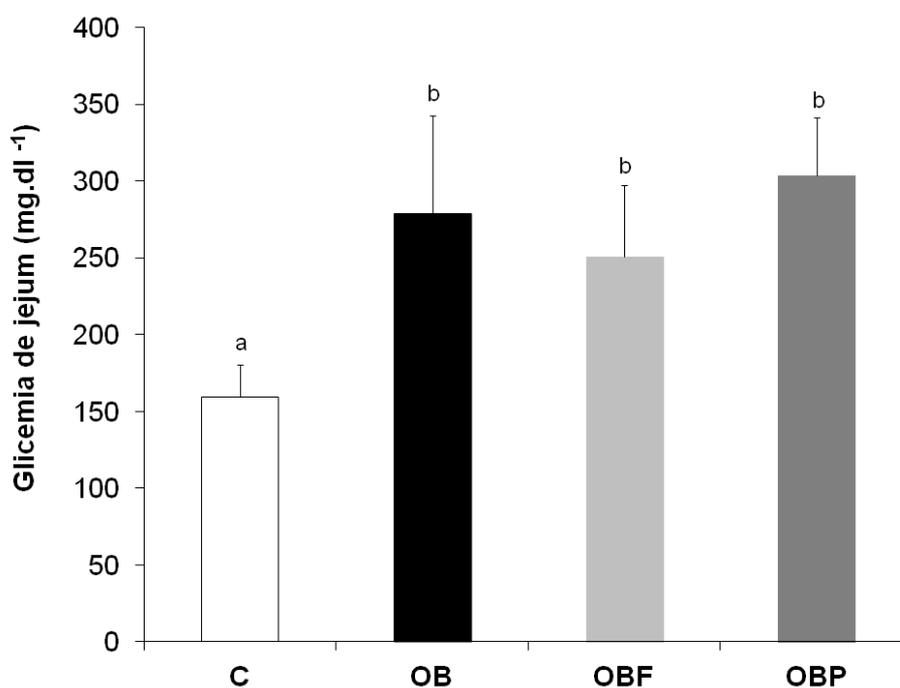


Figura 5. Glicemia de jejum média (mg.dL^{-1}) dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Manzoni et al. (22) estudaram o efeito da ingestão de um produto probiótico à base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* (microrganismo probiótico), *Lactobacillus jugurti* e suplementado com isoflavonas (50 mg de isoflavonas/ 100 g de produto de soja fermentado) por ratos induzidos à hipercolesterolemia. Os autores constataram que a concentração de glicose sanguínea dos animais induzidos à hipercolesterolemia e tratados com o produto probiótico foi significativamente menor quando comparada ao grupo alimentado apenas por dieta hipercolesterolêmica (22).

Em outro estudo conduzido por Kondo et al. (90), ratos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com *Bifidobacterium breve* B-3 a 10^8 ou 10^9 UFC/d, durante oito semanas, apresentaram redução do peso corporal, de gordura epididimal e melhora nos níveis séricos de colesterol total e de glicemia sanguínea de jejum (89).

Da mesma forma, An et al. (90) verificaram que ratos alimentados com dieta de alto teor de lipídios e que receberam *Bifidobacterium pseudocatenulatum* SPM 1204, *Bifidobacterium longum* SPM 1205 e *Bifidobacterium longum* SPM 1207 (10^8 ou 10^9 UFC), durante cinco semanas, exibiram redução do peso corporal, melhora nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, glicose, leptina e redução na atividade das enzimas β -glicosidase e β -glucuronidase (90).

3.6 Avaliação do tecido adiposo e fígado

A administração de dietas experimentais produzidas com alto teor de lipídios (>40% do VET) e com baixo ou moderado conteúdo de carboidratos (9 - 30% do VET) contribui para o aumento do índice de adiposidade ao se relacionar à proporção de depósitos de gorduras brancas epididimal e retroperitoneal (59,86).

No presente estudo, verificou-se um aumento no conteúdo de gordura corporal branca intra-abdominal nos animais de todos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, em comparação ao grupo C (controle não obeso) ($p < 0,01$) (Figura 6), porém sem exibirem diferenças significativas entre si. No entanto, não houve diferença entre os grupos avaliados em relação ao peso do fígado ($p = 0,538$) (Tabela 5).

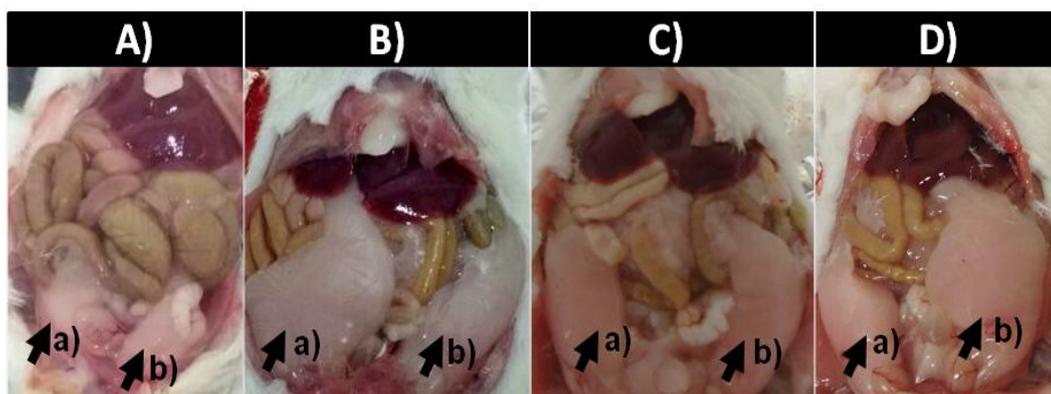


Figura 6. Imagem representativa da região intra-abdominal dos animais dos diferentes grupos estudados.

Setas indicativas da gordura intra-abdominal epididimal direita (a) e esquerda (b). A) animal não obeso (grupo C - controle negativo); B) animal obeso (grupo OB - controle positivo); C) animal que recebeu dieta hiperlipídica e o produto probiótico (grupo OBF); D) animal que recebeu dieta hiperlipídica e o produto

Tabela 5. Peso total da gordura epididimal, retroperitoneal e fígado e valor do Índice de Lee dos diferentes grupos ao final do experimento.

Grupo	Gordura epididimal total (g)	Gordura retroperitoneal total (g)	Fígado (g)	Índice de Lee (g/cm ³)
C	0,79 ± 0,33 ^a	0,24 ± 0,13 ^a	2,05 ± 0,25 ^a	323,44 ± 7,80 ^a
OB	2,80 ± 0,74 ^b	0,72 ± 0,19 ^b	2,27 ± 0,33 ^a	339,29 ± 11,79 ^b
OBF	2,68 ± 0,77 ^b	0,66 ± 0,22 ^b	2,21 ± 0,45 ^a	336,92 ± 10,92 ^{a,b}
OBP	2,29 ± 0,70 ^b	0,62 ± 0,18 ^b	2,15 ± 0,32 ^a	343,04 ± 17,96 ^b

Resultados apresentados como Média ± DP.

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam valores estatisticamente diferentes pela ANOVA e pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Woods et al. (66) administraram uma dieta rica em lipídios (40% Kcal do VET) por 10 semanas e observaram que os animais exibiram um aumento ponderal e de gordura corporal de 10% e 40%, respectivamente, quando comparado ao grupo de animais alimentados com dieta de baixo teor de lipídios (66).

O efeito da ingestão de microrganismos probióticos na deposição de gordura corporal foi estudado por Park, Oh e Cha (91) que constataram não haver redução significativa na quantidade de gordura epididimal de

camundongos alimentados por dieta hiperlipídica (60% Kcal do VET) e suplementados com 10^7 UFC do probiótico *Lactobacillus plantarum* LG42, comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica. No entanto, outro grupo que recebeu a mesma dieta e uma quantidade superior do probiótico (10^9 UFC), obteve redução significativa no depósito de gordura epididimal ($p < 0,05$) (91).

O Índice Nutritivo ou Índice de Lee foi utilizado como forma de mensuração da obesidade ou como estimativa da composição corporal dos camundongos (38,92). No presente estudo, a ingestão do produto probiótico pelo grupo OBF contribuiu com a melhora deste parâmetro (Tabela 5).

Em estudo realizado por Savcheniuk et al. (93) com ratos induzidos à obesidade no período neonatal pela administração de glutamato monossódico, constatou-se que a administração de uma mistura de probióticos (2:1:1 *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB) apresentou efeito protetor quanto ao desenvolvimento da obesidade, uma vez que os valores correspondentes ao Índice de Lee e peso de gordura visceral foram significativamente reduzidos em comparação ao grupo placebo. Além disso, a utilização periódica da mistura de probióticos resultou na recuperação do metabolismo lipídico com diminuição nas frações de VLDL, LDL e aumento de HDL colesterol promovendo, também, a regulação da atividade hormonal do tecido adiposo (93).

3.7 Avaliação morfológica dos adipócitos

O tecido adiposo é dividido em tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom, sendo este último, envolvido na produção de calor e gasto de energia. O tecido adiposo branco, por sua vez, apresenta como principal função o armazenamento de triglicerídeos e liberação de ácidos graxos para a corrente sanguínea. Além disso, é considerado um órgão endócrino por secretar polipeptídeos biologicamente ativos, denominados adipocinas (92).

As adipocinas são conhecidas por atuarem local e sistematicamente, apresentando diferentes funções no organismo como: regulação do apetite, gasto energético, secreção e sensibilidade à insulina, distribuição de gordura, metabolismo de lipídios e glicose, regulação do sistema imune, entre outras (94).

Com o desenvolvimento da obesidade, o tecido adiposo branco sofre um processo de remodelação em que os adipócitos aumentam em número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) (95).

A análise morfométrica dos adipócitos possibilitou identificar diferenças significativas na área e no diâmetro médio das células dos animais submetidos à obesidade, quando comparado ao grupo controle negativo (C). Entre os animais induzidos à obesidade, aqueles que receberam o produto probiótico à base de soja (OBF) apresentaram área e diâmetro das células adiposas significativamente menores ($p < 0,05$) (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6. Área e diâmetro dos adipócitos (média \pm DP) dos animais em estudo.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro (μm)
C	23,50 \pm 13,80 ^a	5,81 \pm 1,05 ^a
OB	67,48 \pm 31,10 ^c	11,98 \pm 2,44 ^c
OBF	56,22 \pm 27,92 ^b	9,19 \pm 1,53 ^b
OBP	70,39 \pm 35,39 ^c	10,96 \pm 2,39 ^c

C=controle não obeso; **OB**=controle obeso; **OBF**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto probiótico; **OBP**=animais alimentados por dieta hiperlipídica e produto placebo. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam valores estatisticamente diferentes pela ANOVA e pós- teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

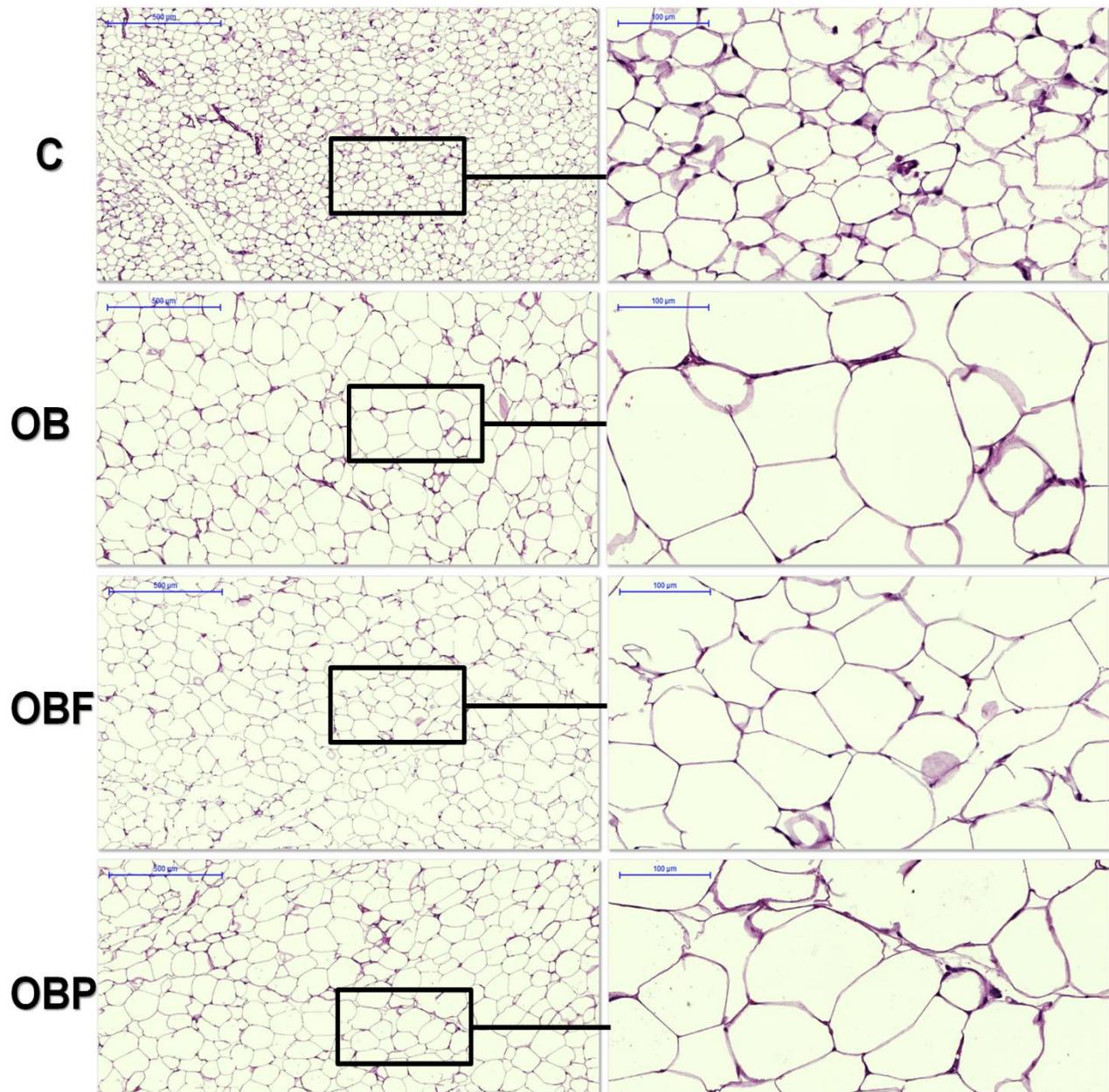


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico das células adiposas do tecido adiposo branco intra-abdominal epididimal dos diferentes grupos estudados. **C** (grupo controle não obeso); **OB** (grupo controle obeso); **OBF** (animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto probiótico); **OBP** (animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto placebo).

Verificou-se o acúmulo de macrófagos em torno das células (*crown-like structures*) nos grupos induzidos à obesidade o que está relacionado à disfunções metabólicas devido a um estado de inflamação sistêmica (96-98).

Os macrófagos possuem a habilidade inata de adaptar sua fisiologia e responder a mudanças imunológicas e necessidades do hospedeiro em resposta a uma infecção ou dano tecidual, adquirindo um fenótipo inflamatório caracterizado pela produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL) - 12 e IL-1 β (45).

Manzoni et al. (22) estudaram os efeitos de um produto fermentado por *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* e suplementado com isoflavonas sobre o tecido adiposo de ratos jovens. A hiperlipidemia foi induzida pela ingestão de dieta enriquecida com colesterol durante três semanas e, após esse período os animais foram tratados com produto fermentado e suplementado com isoflavonas e produto placebo suplementado ou não com isoflavonas. Os autores constataram que a circunferência dos adipócitos provindos dos depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal no grupo que consumiu o produto fermentado suplementado com isoflavonas era inferior a dos demais grupos induzidos à hiperlipidemia. Esse efeito foi atribuído, principalmente, ao microrganismo probiótico, pois nos grupos placebo, com e sem suplementação, a área dos adipócitos foi maior ($p < 0,05$) (22).

Da mesma forma, a investigação sobre os efeitos anti-obesidade da cepa *Lactobacillus casei* Shirota em ratos alimentados por dieta rica em gordura, mostrou que o tamanho dos adipócitos dos animais que receberam o probiótico era significativamente menor que os do grupo alimentado apenas por dieta hiperlipídica (99).

3.8 Análise de citocinas no tecido adiposo

A obesidade gera um estado inflamatório de baixo grau, originado principalmente da ativação de células imunes inatas, como os macrófagos (100).

Nos indivíduos obesos, os macrófagos residentes no tecido adiposo sofrem alterações fenotípicas em que há diferenciação pró-inflamatória do macrófago M1 (classicamente ativado), devido ao aumento na produção de interferon gama (IFN γ) por células T, levando a respostas imunes inadequadas (101). A cascata da resposta inflamatória ativada pelas citocinas pode interferir na sinalização de insulina no tecido adiposo, fígado, músculo esquelético e sistema nervoso central (SNC), favorecendo o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (102).

A utilização de microrganismos probióticos favorece a ativação dos macrófagos M2 (alternativamente ativados) por células T secretoras de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-13 e IL-10, e que são dominantes no tecido adiposo magro (103). Desse modo, o equilíbrio entre macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios) desempenha um papel importante na inflamação do tecido adiposo e em complicações associadas, como na resistência à insulina (104).

No presente estudo, foi investigada a expressão de RNAm das citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo branco, para estimar o efeito do consumo do probiótico na resposta imune (Figura 8 e Apêndice 3).

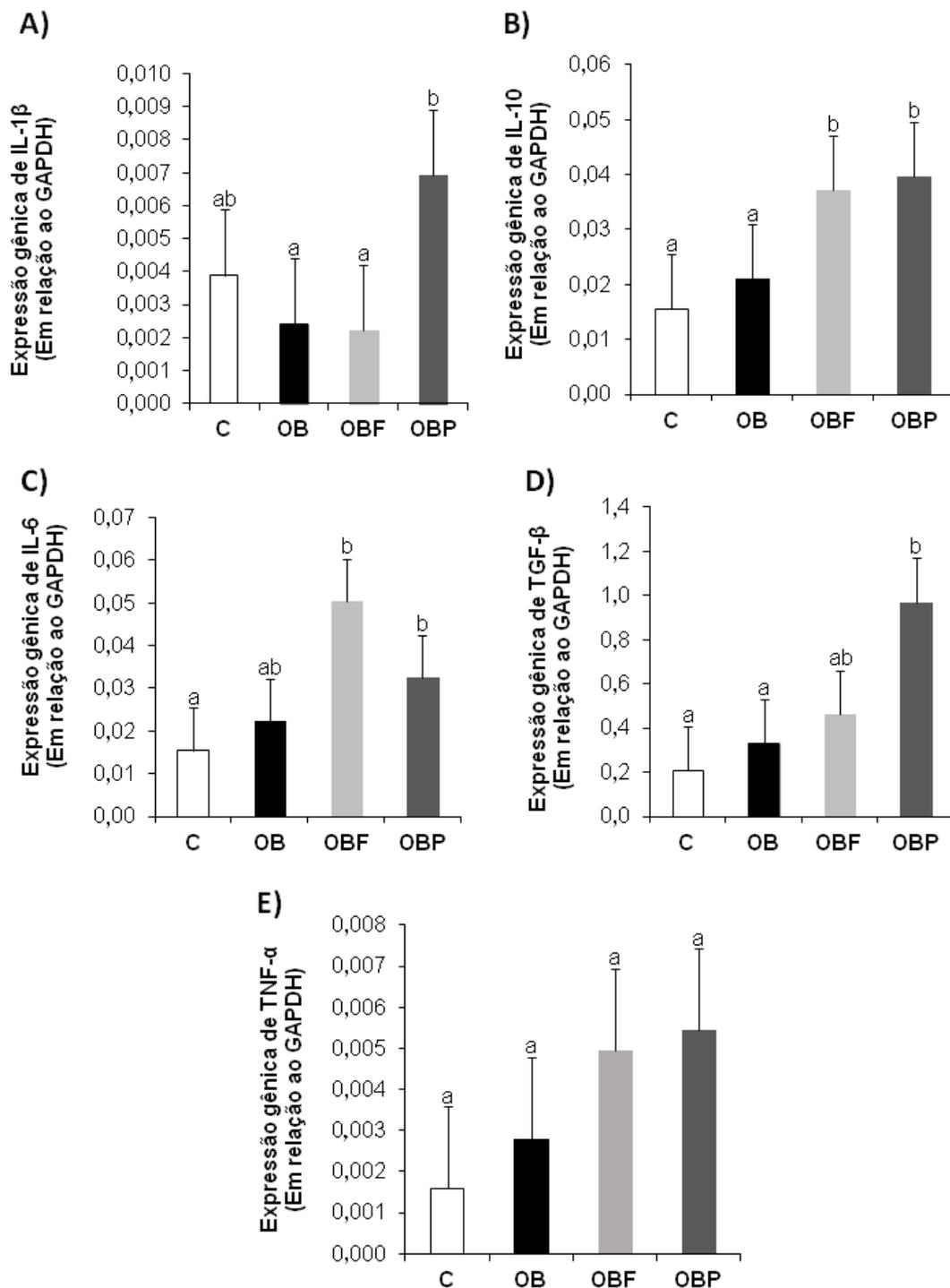


Figura 8. Expressão relativa de citocinas em relação ao gene endógeno GAPDH no tecido adiposo branco intra-abdominal retroperitoneal de camundongos.

(A) Níveis de expressão de Interleucina 1 beta (IL-1 β); **(B)** Níveis de expressão de Interleucina 10 (IL-10), **(C)** Níveis de expressão de Interleucina 6 (IL-6); **(D)** Níveis de expressão de Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β); **(E)** Níveis de expressão de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

C (grupo controle negativo, não obeso); **OB** (grupo controle positivo, obeso); **OBF** (grupo experimental, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto probiótico); **OBP** (grupo placebo, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto placebo).

^{ab} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pela ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Dentre os grupos avaliados, os que receberam o produto probiótico (OBF) e o placebo (OBP) apresentaram níveis de IL-6 e IL-10 significativamente superiores (Figura 8).

A IL-6 é secretada principalmente por adipócitos do tecido adiposo visceral e apresenta concentrações elevadas durante a obesidade sendo, na maioria dos casos, considerada uma citocina pró-inflamatória assim como o TNF- α e a IL-1 β (95). No entanto, estudos recentes indicam que a sinalização de IL-6 durante a inflamação ou distúrbios metabólicos como na obesidade e diabetes mellitus tipo 2, apresenta papel homeostático anti-inflamatório, e que a complexidade nas funções biológicas se estendem à múltiplas configurações e tipos celulares (105-110).

Durante a fase aguda da inflamação a IL-6 pode aumentar a IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e dos receptores de TNF solúveis (sTNF-R). Além disso, a IL-6 parece ter influência central sobre a regulação do apetite, gasto energético e composição corporal (105,111-112).

Matthews et al. (113) constataram que camundongos em dieta normal e com deleção total de IL-6 (IL-6(-/-)) apresentaram obesidade, inflamação do fígado e resistência à insulina, quando comparados aos animais controle, sem que houvesse alteração no consumo alimentar. Quando os dois grupos foram submetidos à alimentação rica em gorduras, houve ganho equivalente de peso corporal, massa gorda e deposição lipídica ectópica no fígado, porém, maior inflamação do fígado e resistência à insulina nos animais com deleção de IL-6 (IL-6(-/-)). Sugerindo, portanto, que a deficiência de IL-6 pode levar à resistência à insulina e inflamação hepática (113).

A produção de IL-6 é regulada transcricionalmente e pós-transcricionalmente, sendo que quando há homeostase do sistema, a produção é interrompida. Entre outras funções, a superexpressão de IL-6 potencializa o gasto energético e pode aumentar a disponibilidade de substratos como a glicose e lipídios a partir da lipólise e glicogenólise no músculo esquelético, principalmente por meio da ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP) (107-108).

Indivíduos com obesidade grave e metabolicamente saudáveis apresentam imunorregulação efetiva no combate da inflamação crônica com aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β no tecido adiposo (114).

A IL-10 apresenta efeitos pleiotrópicos, sendo considerada predominantemente bloqueadora das respostas imunes, pois inibe, por exemplo, a produção de citocinas TNF- α e IL-1 β por macrófagos ativados. O desenvolvimento da obesidade está associado a uma redução de IL-10, no entanto, esta condição pode ser melhorada por meio da administração de microrganismos probióticos (115).

A microbiota intestinal desempenha papel fundamental na manutenção do equilíbrio imune, além disso, alterações na composição da microbiota podem promover consequências inflamatórias e distúrbios metabólicos. O consumo de produtos probióticos promove a manutenção da barreira intestinal e modulação do sistema imune do hospedeiro podendo reduzir a inflamação em indivíduos com sobrepeso ou obesidade (116).

Fabersani et al. (117), investigaram a ação de diferentes cepas de bactérias lácticas sobre a capacidade de modular a secreção de adipocinas no tecido adiposo, utilizando uma técnica *in vitro*. Os autores constataram que as bactérias lácticas exercem diferentes efeitos na produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 em adipócitos. A cepa *Lactococcus lactis* CRL1434 induziu valores mais altos de TNF- α ; MCP-1 e IL-10 em comparação a outras cepas, enquanto a cepa *Lactobacillus plantarum* CRL350 induziu níveis mais elevados de IL-6 (117).

Ao final do protocolo experimental, observou-se, no presente estudo, que os níveis expressos de TGF- β foram maiores no grupo placebo (OBP) ($p < 0,05$) comparando-o aos controles negativo e positivo (Figura 8D).

O TGF- β apresenta efeitos na diferenciação celular e modulação da resposta imune, bloqueando a ativação de citocinas pró-inflamatórias e inibindo a ativação de macrófagos e proliferação de células T (118).

Considerando que o grupo OBF apresentou ganho de peso inferior ao do grupo obeso (OB) até a 9ª semana do estudo, sugere-se a realização de

estudos que avaliem o efeito do produto probiótico à base de extrato aquoso de soja na modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias em diferentes fases da indução da obesidade. Tais resultados auxiliarão no melhor entendimento do papel das citocinas no processo inflamatório associado à obesidade.

3.9 Determinação da composição da microbiota fecal

Estudos evidenciam que a microbiota intestinal normal é composta principalmente pelos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* e em menor proporção pelos filos *Actinobacteria*, *Proteobactérias* e *Verrumicrobia*. O filo *Bacteroidetes* é formado pelos gêneros *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Parabacteroides* spp., *Porfiromonas* spp., *Alistipes* spp. e o filo *Firmicutes* composto pelos gêneros *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* spp., entre outras bactérias Gram-positivas (119-120).

O consumo excessivo de alimentos com alto teor energético e baixa qualidade nutricional, constituído essencialmente de lípidios e açúcares, pode levar à disbiose intestinal, disfunções metabólicas e desequilíbrio imune (121).

Considerando o total de táxons bacterianos analisados antes (T0) e após (T70) a indução da obesidade e administração dos produtos probiótico e placebo, verificou-se que inicialmente houve predominância do gênero *Bacteroides* spp. (pertencente ao filo *Bacteroidetes*) nas amostras de fezes de todos os grupos experimentais (C=99,73%; OB=99,72%; OBF=96,76% e OBP=86,97%). Da mesma forma, ao final do protocolo experimental, este mesmo gênero foi predominante em todos os grupos, além de ser constatado aumento na proporção de microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. (filo *Firmicutes*) nos animais induzidos à obesidade, especialmente nos pertencentes aos grupos OB e OBP. O percentual de *Bacteroides* spp. correspondeu a 99,78% no grupo C, 91,47% no grupo OBF, 74,47% no grupo OB e 51,61% no grupo OBP. Por

outro lado, a proporção de *Lactobacillus* spp. foi de 48,39%, 25,53%, 8,53% e 0,22%, nos grupo OBP, OB, OBF e C, respectivamente (Figura 9).

Ao término do experimento as proporções do gênero *Bifidobacterium* spp. foram equivalentes a 0,0020% no grupo C, 0,0014% no grupo OBF, 0,0008% no grupo OBP e 0,0005% no grupo OB. Situação semelhante foi verificada para o gênero *Clostridium* spp. com proporções de 0,0018% (grupo OBP), 0,0006% (grupo OBF), 0,0004% (grupo OB) e 0,0003% (grupo C) (Figura 9).

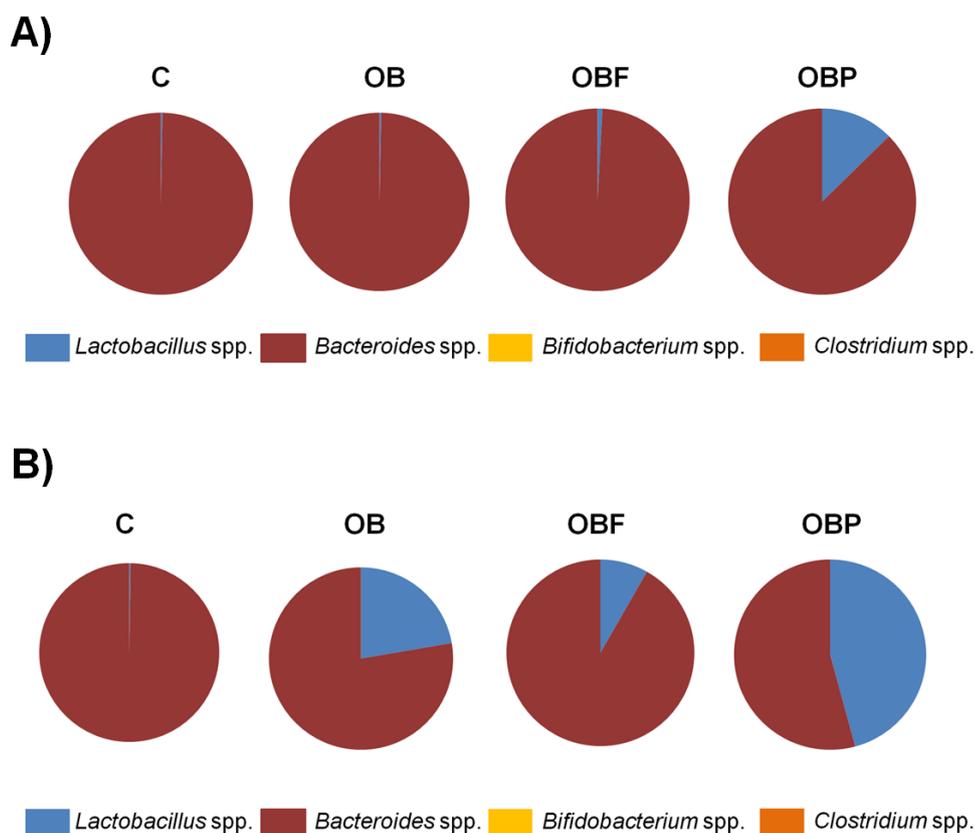


Figura 9. Proporção geral de microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. nos diferentes grupos experimentais, sendo **A)** Proporção determinada no tempo inicial (T0) e **B)** Proporção determinada no tempo final (T70).

C (grupo controle negativo, não obeso); **OB** (grupo controle positivo, obeso); **OBF** (grupo experimental, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto probiótico); **OBP** (grupo placebo, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto placebo).

Conforme demonstrado na Figura 10, embora os gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Clostridium* spp. tenham apresentado proporções

muito pequenas em todos os grupos estudados, a comparação intra-grupos - tempos inicial (T0) e final (T70) - indicou aumento significativo de 63,22% ($p < 0,05$), de *Bifidobacterium* spp. (filo *Actinobacteria*) no grupo OBF e de 83,25% ($p < 0,05$) de *Clostridium* spp. (filo *Firmicutes*) no grupo OBP.

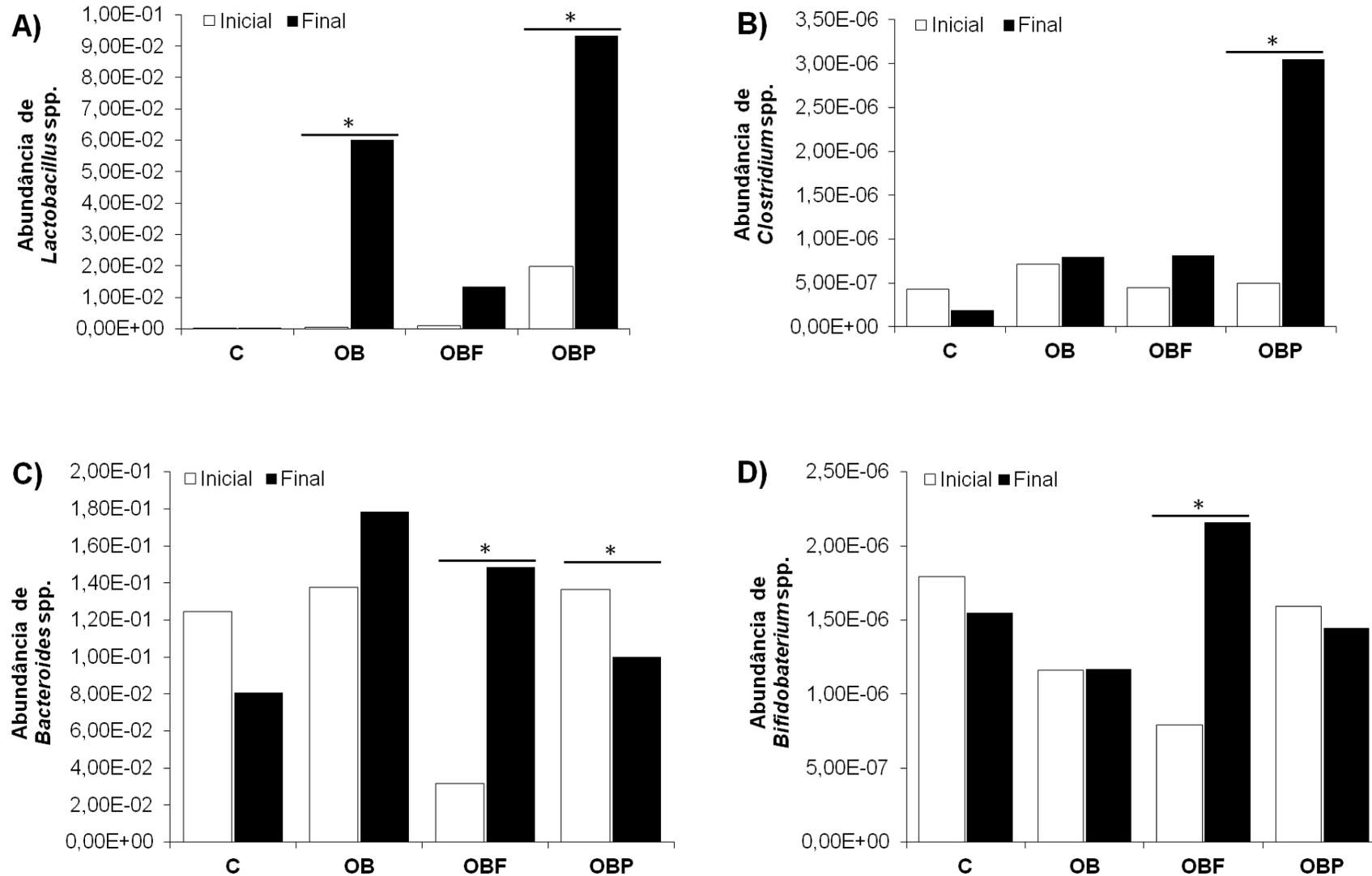


Figura 10. Quantificação dos gêneros microbianos com relação à bactérias totais nas amostras de fezes dos grupos C, OB, OBF e OBP sendo, *Lactobacillus* spp. (A), *Clostridium* spp. (B) *Bacteroides* spp. (C) e *Bifidobacterium* spp. (D). C (grupo controle negativo, não obeso); OB (grupo controle positivo, obeso); OBF (grupo experimental, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto probiótico); OBP (grupo placebo, animais que receberam dieta hiperlipídica e o produto placebo). (*) Indica diferença significativa intragrupos pelo teste *Komolgorov-Smirnov*, $p < 0,05$.

Wang, et al. (122) compararam os efeitos individuais de três cepas probióticas sobre a composição da comunidade microbiana intestinal em camundongos induzidos à síndrome metabólica por dieta rica em lipídios. As cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4270 (LC), *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (LR) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CNCM I-2494 (BA) interferiram de forma diferente sobre a inflamação do hospedeiro e a fermentação microbiana intestinal. Além disso, constataram que, apesar dos probióticos reverterem parcialmente as alterações ocorridas na composição da microbiota intestinal, cada cepa apresentou influência seletiva no subconjunto específico de espécies bacterianas e que foram significativamente associadas a uma ou mais características envolvidas na progressão da obesidade. As doze semanas de alimentação hiperlipídica promoveram abundância de *Firmicutes* e *Proteobacteria* e redução em *Bacteroides* e *Actinobacterias*. No entanto, apenas o LR atenuou o aumento de *Proteobacterias* e reduziu *Actinobacterias* (122).

Bagarolli, et al. (123) investigaram os efeitos dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* sobre microbiota intestinal, alterações na permeabilidade do epitélio intestinal e sensibilidade à sinalização de insulina em camundongos *Swiss* alimentados por dieta hiperlipídica (55% do VET correspondente aos lipídios), durante 12 semanas. A dieta rica em lipídios promoveu modificações na composição da microbiota intestinal acompanhada de aumento da permeabilidade intestinal, translocação de LPS e inflamação sistêmica de baixo grau. No entanto, o grupo que recebeu os microrganismos probióticos por cinco semanas após a indução da obesidade por dieta, apresentou melhora na resistência à insulina e leptina hipotalâmica, modulação da microbiota intestinal (manutenção de *Bacteroidetes*, aumento de *Actinobacterias* e redução de *Firmicutes*) além de ganharem significativamente menos peso ao longo do estudo (123).

Existem alguns mecanismos não excludentes envolvidos na relação entre composição da microbiota intestinal e obesidade. Entre eles merecem destaque: a capacidade de produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

(butirato, propionato e acetato) por bactérias intestinais, que promovem mudanças na motilidade intestinal e facilitam a absorção de nutrientes e energia da dieta; a inflamação crônica de baixo grau devido aos lipopolissacarídeos (LPS) provenientes das membranas celulares externas de bactérias Gram-negativas e a desregulação do fator adiposo induzido por jejum (FIAF), pelos microrganismos intestinais, levando à deposição de triglicerídeos em adipócitos (124-125). Dessa forma, alterações positivas na composição da microbiota intestinal relacionam-se com a susceptibilidade individual à obesidade.

4 Conclusões

A ingestão regular do produto probiótico reduziu o ganho de peso no grupo OBF, em comparação ao grupo obeso (OB), até a 9ª semana do estudo. Além disso, os adipócitos do grupo OBF se mostraram com menor grau de hipertrofia e a análise de expressão de citocinas evidenciou aumento naquelas relacionadas à homeostase metabólica e controle de processos inflamatórios associados à obesidade (IL-10 e IL-6).

Os resultados indicam que os efeitos benéficos verificados em relação à prevenção da obesidade no grupo OBF parecem estar relacionados à modulação na composição da população de microrganismos presentes no intestino, uma vez que, o consumo diário da bebida fermentada probiótica foi relacionado à manutenção do equilíbrio na proporção de microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. (filo *Firmicutes*) além de promover um aumento na população de *Bacteroides* spp. (filo *Bacteroidetes*) e *Bifidobacterium* spp. (filo *Actinobacteria*).

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, DeJani 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 histomorfométricas 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 rhamnosus* 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, Correa-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, Aguiar 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.

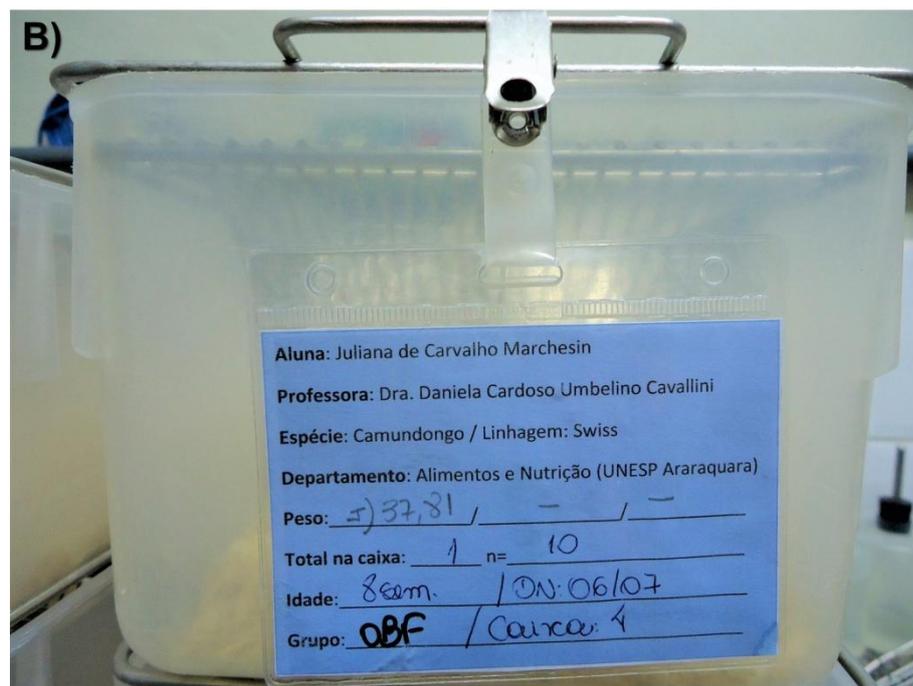
67. Hendaus MA, Jomha FA and Ehlayel M. Allergic diseases among children: nutritional prevention and intervention. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2016; 12: 361-372. doi: 10.2147/TCRM.S98100.

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.

Apêndices

Apêndice 1. Imagens representativas das instalações utilizadas no protocolo experimental. A) estante de ar ALESCO para acondicionamento dos animais; B) caixa de polipropileno para alojamento dos camundongos contendo anotações de controle fixadas à mesma.

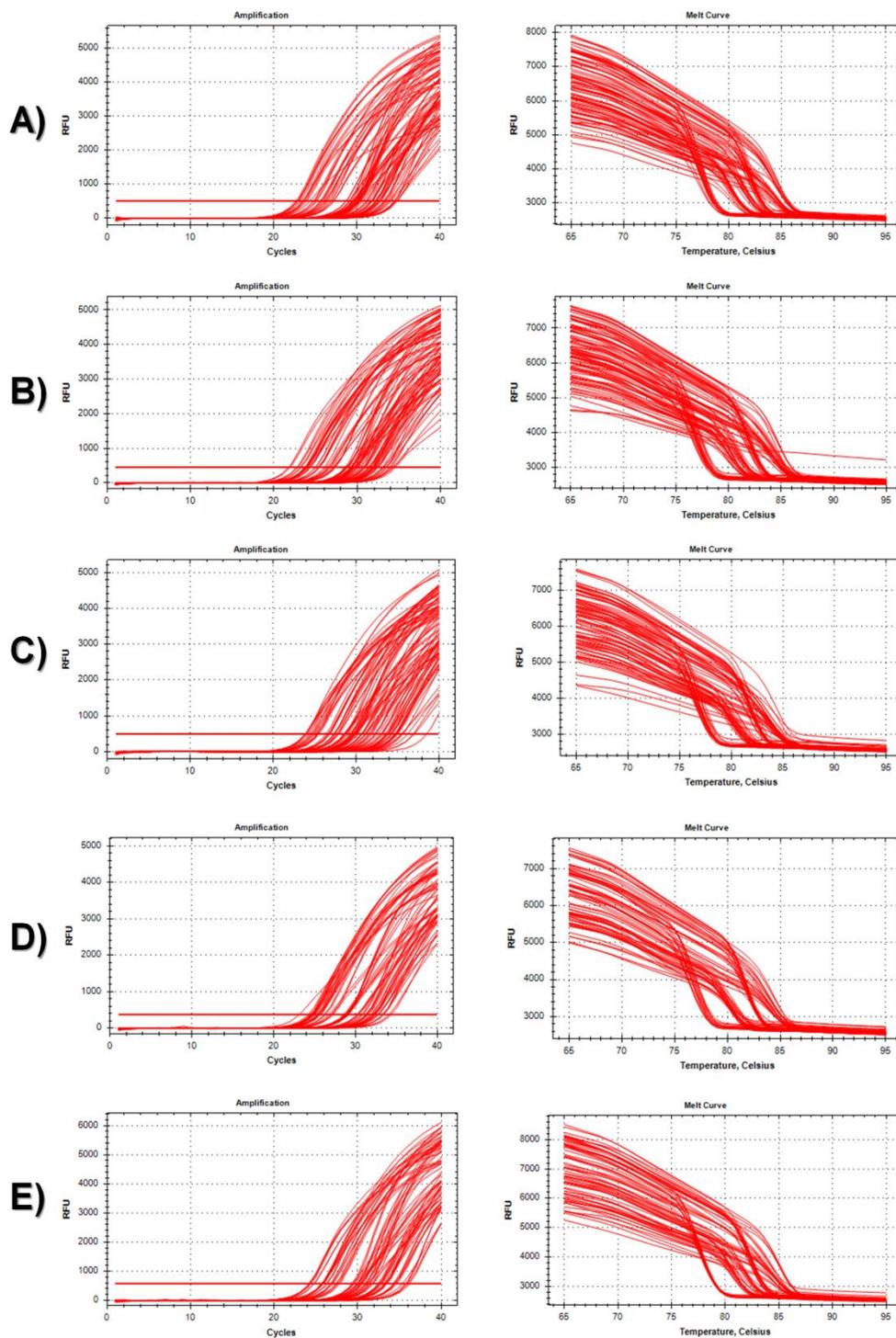


Apêndice 2. Imagens representativas das etapas do protocolo experimental. A) administração de gavagem para camundongo por meio de agulha de aço inoxidável para camundongos; B) determinação do peso corporal do camundongo em balança semi-analítica.



Apêndice 3. Imagem representativa das curvas de amplificação e respectivas curvas de *melting* dos genes estudados (il-1b, il-6, il-10, tnf-a, tgf-b, gapdh).

A) Amplificação gerada para o grupo C; **B)** Amplificações geradas para o grupo C e OB; **C)** Amplificações geradas para o grupo OB e OBF; **D)** Amplificação gerada para o grupo OBF; **E)** Amplificação gerada para o grupo OBP.



Anexos

Anexo 1. Protocolo de aprovação em estudo com animais disponibilizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFar UNESP, Araraquara.

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 05/2016

Interessada: JULIANA DE CARVALHO MARCHESIN

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

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

Parecer nº 18/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Influência de um produto probiótico à base de soja sobre a composição da microbiota intestinal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica", apresentado pela pós-graduanda JULIANA DE CARVALHO MARCHESIN, sob orientação da Professora Doutora Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em SETEMBRO de 2017, em formulário para este fim.

Araraquara, 31 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo 2. Composição nutricional da dieta hiperlipídica administrada aos animais em estudo.

Ingredientes	Dieta hiperlipídica (DHL)		
	Quantidade (%)	Kcal/Kg	Kcal (%)
Amido de milho	4,43	177,20	3,44
Farelo de soja moído	41,00	1325,53	25,75
Amido dextrinizado	5,00	200,00	3,89
Sacarose	8,00	320,00	6,22
Banha	30,20	2718,00	52,80
Óleo de soja	4,00	360,00	6,99
Celulose microcristalina	2,54	-	-
L-cistina	0,18	7,20	0,14
Bitartarato de colina	0,15	-	-
Butil-hidroxitolueno	0,00	-	-
*Mix mineral AIN 93	3,50	-	-
*Mix vitamina AIN 93	1,00	40,00	0,78
Total	100,00	5147,93	100,00

Dieta hiperlipídica (DHL): 18,63% de proteínas (14,48% do VET); 34,9% de lipídios (61,01% do VET) e 31,55% de carboidratos (24,51% do VET).

*Composição das misturas salínica (Mix mineral AIN 93) e vitamínica (Mix vitamina AIN 93) apresentada em anexo (Anexos 1 e 2).

Kcal/Kg: quilocaloria/quilograma.

Composição da dieta adaptada de Lenquiste, Marineli, Moraes, et al. (27).

Anexo 3. Composição da Mistura Salínica (MIX).

Componentes	Ração hiperlipídica (g/Kg de Mix)
Carbonato de cálcio anidro	357,0
Fosfato de potássio monobásico	250,0
Cloreto de sódio	74,0
Citrato de potássio	28,0
Sulfato de potássio	46,6
Óxido de magnésio	24,0
Citrato férrico	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato cúprico	0,30
Iodato de potássio	0,01
Selenito de sódio anidro	0,01025
Paramobilidato de amônio tetrahidratado	0,00795
Meta-silicato de sódio 9-hidratado	1,45
Sulfato de potássio e crômo	0,275
Cloreto de lítio	0,0174
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066
Sacarose	209,8

Composição da mistura salínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (26).

Anexo 4. Composição da Mistura Vitamínica.

Componentes	Ração hiperlipídica (g/Kg de Mix)
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D3	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,65

Composição da mistura salínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (26).