UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

Efeito de probiótico (*Bifidobacterium lactis*) e simbiótico (*Bifidobacterium lactis* e frutooligossacarídeo) sobre a microbiota intestinal, perda de peso corporal e parâmetros metabólicos de mulheres com obesidade

Louise Crovesy de Oliveira

Orientadora: Profª Drª Eliane Lopes Rosado

Rio de Janeiro
Fevereiro 2020

Louise Crovesy de Oliveira

Efeito de probiótico (*Bifidobacterium lactis*) e simbiótico (*Bifidobacterium lactis* e frutooligossacarídeo) sobre a microbiota intestinal, perda de peso corporal e parâmetros metabólicos de mulheres com obesidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências Nutricionais.

Orientador: Profª Drª Eliane Lopes Rosado

Rio de Janeiro

Fevereiro 2020

EFEITO DE PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM LACTIS*) E SIMBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM LACTIS* E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO) SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL, PERDA DE PESO CORPORAL E PARÂMETROS METABÓLICOS DE MULHERES COM OBESIDADE

Louise Crovesy de Oliveira

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS NUTRICIONAIS.

Examinada por:

_____

Profª Drª Tatiana El-Bacha Porto

Doutora em Química biológica - Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª Maria das Graças Tavares do Carmo

Doutora em Farmacologia - Universidade Federal de São Paulo

_____

Profª Drª Márcia Soares da Mota Silva e Lopes

Doutora em Ciências biológicas - Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª Karla Rodrigues Miranda

Doutora em Ciências - Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª Marta Citelli dos Reis

Doutora em Química biológica – UniversidadeFederal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Fevereiro de 2020

de Oliveira, Louise Crovesy.

Efeito de probiótico (*Bifidobacterium lactis*) e simbiótico (*Bifidobacterium lactis* e frutooligossacarídeo) sobre a microbiota intestinal, perda de peso corporal e parâmetros metabólicos de mulheres com obesidade / Louise Crovesy de Oliveira. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2020.

158 f. : il. ; 31 cm.

Orientadora: Eliane Lopes Rosado.

Tese (doutorado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2020.

Referências bibliográficas: f. 105-124.

1. Probióticos. 2. Simbióticos. 3. Obesidade. 4. Microbiota. 5. Microbioma gastrointestinal. 6. Interações entre hospedeiro e microrganismos. 7. Metabolômica. I. Rosado, Eliane Lopes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição. III. Título.

Dedicatória

Dedico a presente tese à minha mãe e ao meu noivo que sempre estiveram ao meu lado durante toda a trajetória desde a graduação, torcendo e me apoiando nos momentos mais difíceis deste caminho. Sem eles não seria possível adquirir o tão sonhado título de doutora.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar a Deus por permitir que eu pudesse passar por esta experiência intensa, que foi o doutorado, e por ter me dado força e energia necessárias para completar este longo caminho.

Ao meu noivo por toda paciência e compreensão da minha ausência durante estes anos de estudo para alcançar meus objetivos.

À minha mãe que sempre acreditou no meu potencial e que não permitiu que eu desistisse, mesmo nos momentos mais difíceis enfretados durante a trajetória.

À minha irmã e sobrinhos por torcerem pelo meu sucesso e terem orgulho do caminho que venho trilhando.

Aos meus sobrinhos, Valentim, Miguel, Theo, Vitor e Bella por me motivarem a ser um exemplo para eles. Espero que eu possa ser fonte de inspiração e mostrar que eles podem seguir seus sonhos e serem o que quiserem.

À orientadora Drª. Eliane Lopes Rosado, por acreditar que eu daria conta de todas as tarefas confiadas a mim durante o tempo em que me orientou, por ter compartilhado seus conhecimentos e pelas oportunidades geradas ao longo do doutorado.

Aos professores Drª. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues e Dr. Leandro Araujo Lobo pelo acolhimento em seu laboratório. Sem o suporte deles e o compartilhamento de seus conhecimentos a pesquisa que gerou a presente tese não teria acontecido.

À professora Drª. Karla Rodrigues Miranda por seus ensinamentos sobre a técnica de avaliação da microbiota e paciência em dar suporte durante esta jornada.

À professora Drª. Tatiana El-Bacha Porto pelo seu conhecimento e por todo auxílio no entendimento dos resultados da metabolômica encontrados na pesquisa. Sem seu auxílio não teria aprendido uma nova técnica.

À CAPES e FAPERJ pelo investimento em mim durante quase todo o doutorado. Sem a bolsa não teria conseguido tocar o doutorado.

Por fim, a todas as voluntárias que participaram da pesquisa. Sem elas nada disso teria sido possível. Espero ter podido causar alguma transformação em suas vidas.

“Tudo que é seu encontrará uma forma de chegar até você”

Chico Xavier

APRESENTAÇÃO

Ao longo destes 4 anos de estudos no doutorado tive a oportunidade de agregar muito conhecimento, não apenas oriundos das disciplinas cursadas, mas também a partir do aprendizado de novas técnicas e do estudo aprofundado para adiquirir uma compreensão melhor sobre o tema da pesquisa.

Além da dedicação às obrigações formais do doutorado, como disciplinas, desenvolvimento da pesquisa, escrita da tese e produção de artigos frutos do estudo elaborado neste período, também me debrucei em trabalhos paralelos que acrescentaram tanto no meu crescimento pessoal como profissional.

Aqui destaco os trabalhos produzidos ao longo desta trajetória. Em 2018, foram publicados o artigo intitulado "Unsaturated fatty acids do not have a favourable metabolic response in overweight subjects: Results of meta-analysis" na revista Journal of Functional Foods, e o capítulo de livro "Fatty acids, gut microbiota, and the genesis of obesity", produto da disciplina Fisiologia e bioquímica da nutrição, em parceria com a professora responsável e os demais alunos que cursaram a disciplina.

No ano de 2019, a seguinte produção foi publicada: "Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity" na Nutrition, fruto da busca para construção do seminário de atualização científica.

Em 2020, o artigo "Profile of gut microbiota of adults with obesity: a systematic review" foi publicado na European Journal of Clinical Nutrition. Este trabalho foi gerado a partir da lacuna a respeito da composição da microbiota intestinal associada com a obesidade.

Além dos artigos publicados, alguns manuscritos também foram submetidos a periódicos e, atualmente, estão a espera do parecer do editor, quais sejam "Effect of coconut oil on weight loss and metabolic parameters in men with obesity: A randomized controlled clinical trial" e "Profile of polyphenols intake by women with different class of obesity: consumption of these compounds does not reflect healthy eating".

Resumo da tese apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **doutor em Ciências Nutricionais**.

EFEITO DE PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM LACTIS*) E SIMBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM LACTIS* E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO) SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL, PERDA DE PESO CORPORAL E PARÂMETROS METABÓLICOS DE MULHERES COM OBESIDADE

Louise Crovesy de Oliveira

Fevereiro/2020

Orientador: Eliane Lopes Rosado

Obesidade é uma doença complexa, multifatorial e de difícil controle. Alteração na microbiota intestinal vem sendo associada ao desenvolvimento de obesidade, por aumentar extração de energia dos alimentos, endotoxemia metabólica e alteração o funcionamento do metabolismo do hospedeiro. Modulação da microbiota por probióticos e simbióticos poderiam reequilibrar as bactérias, levando a perda de peso corporal, melhora da inflamação e parâmetros associados à doença. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do probiótico (*Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*)) e do simbiótico (*B. lactis* e frutooligossacarídeo (FOS)) sobre a composição da microbiota intestinal, perfil metabólico, peso corporal, glicemia, lipemia e pressão arterial de mulheres com obesidade, e se os efeitos sobre a perda de peso e composição da microbiota intestinal se mantinham 15 dias após o seu uso. Trata-se de um ensaio clínico paralelo, duplo cego, randomizado e controlado, no qual 32 mulheres com obesidade graus I e II receberam cápsulas contendo 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *B. lactis* e sachês com 5g de maltodextrina (GP), cápsulas com 10^9 UFC de *B. lactis* e sachês com 5g de FOS (GS) ou cápsulas e sachês placebo (GC) associados à dieta hipocalórica por 60 dias. Variáveis antropométricas, dietéticas, laboratoriais, clínicas, composição da microbiota intestinal e perfil metabólico foram analisadas antes e após intervenção. E variáveis antropométricas, dietéticas, clínicas e de composição da microbiota também foram avaliadas após 15 dias do término da intervenção. Após 60 dias, houve redução de triglicerídeos (142,5±40,8 *vs* 111,2±33.4, p=0,028) no GP, peso corporal (93,0±8,6 *vs* 90,8±8,4, p=0,027) e IMC (36,3±10,1 *vs* 35,5±2,1, p=0,033) no GS, comparados ao iníco.

GS teve aumento em *Verrucomicrobia*, comparado ao T75, e maior distinção de metabólitos. GS mostrou redução de glicerol, aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), citrato e isoleucina, e aumento de piruvato, arginina, glutamina e alanina, e GP redução de metabólitos associados ao lipídio. GP mostrou correlação negativa de *Verrucomicrobia* com lactato e $(CH_2)_n$ lipídio, de *Firmicutes* com VLDL/LDL e $(CH_2)_n$ lipídio, e correlação positiva entre *Verrucomicrobia* e isoleucina, *Firmicutes* com isoleucina e AACR. No GS houve correlação positiva entre *Bacteroidetes* e glicerol e correlação negativa entre massa gorda corporal, glutamina e arginina. Após 15 dias do término da intervenção, GP aumentou γ-*Proteobacteria*, comparado aos demais grupos e tempos, reduziu consumo de calorias (T0:1791,88±613,35 *vs.* T60:1254,81±358,76, p=0,027) e carboidrato (GP:46,10±10,61 *vs.* GS:62,76±13,54, p=0,040), comparado ao início e GS, respectivamente. Probiótico associado à dieta hipocalórica por 60 dias reduz triglicerídeos e metabólitos associados ao lipídio. Enquanto, simbiótico promove discreta perda de peso, aumento de *Verrucomicrobia* e maiores alterações no metabolismo do hospedeiro.

Palavras-chave: obesidade, probiótico, simbiótico, *Bifidobacterium lactis*, frutooligossacarídeo, perda de peso, lipemia, glicemia, pressão arterial, microbiota intestinal, metabolômica.

EFFECT OF PROBIOTIC (*BIFIDOBATERIUM LACTIS*) AND SYMBIOTIC (*BIFIDOBATERIUM LACTIS* AND FRUCTOOLIGOSACCHARIDE) ON GUT MICROBIOTA, WEIGHT LOSS AND METABOLIC PARAMETERS IN WOMEN WITH OBESITY

Louise Crovesy de Oliveira

February/2020

Advisor: Eliane Lopes Rosado

Obesity is a complex, multifactorial and difficult to control disease. Change in gut microbiota composition has been associated with the development of obesity, through energy extraction from food increased, metabolic endotoxemia, and changes in host metabolism. Microbiota modulation by probiotics and symbiotics could balance the bacteria, leading weight loss, improvement inflammation and parameters associated with disease. The aim of the study was to evaluate the effects of probiotic (*Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*)) and symbiotic (*B. lactis* and fructooligosaccharide (FOS)) on the gut microbiota composition, metabolic profile, body weight, blood glucose, lipid profile and blood pressure in women with obesity, and whether the effects on weight loss and gut microbiota were maintained 15 days after end of the intervention. A double-blind, parallel, randomized, controlled clinical trial was performed with 32 women with class I and II obesity received capsules containing 10^9 colony forming units (CFU) of *B. lactis* and sachets containing 5g of maltodextrin (PG), capsules containing 10^9 CFU of *B. lactis* and sachets with 5g FOS (SG) or capsules and sachets placebo (CG) associated with low-caloric diet for 60 days. Anthropometric, dietary, laboratorial, clinical, gut microbiota composition and metabolomic profile variables were analyzed before and after intervention. Anthropometric, dietary, clinical and gut microbiota composition also were evaluated 15 days after end of the intervention. After 60 days of intervention, there was reduction in triglycerides (142.5 ± 40.8 vs 111.2 ± 33.4, p=0.028) in PG, body weight (93.0 ± 8.6 vs 90.8 ± 8.4, p=0.027) and BMI (36.3 ± 10.1 vs 35.5 ± 2.1, p=0.033) in SG, compared to the baseline. SG had increase in *Verrucomicrobia*, compared to T75, and greater distinction of metabolites. SG showed reduction in glycerol, branch-chain amino acids (BCAA), citrate and isoleucine decreased, and increase in pyruvate, arginine, glutamine and alanine, while in PG lipid associated to metabolites decreased. PG showed

negative correlation of *Verrucomicrobia* with lactate and $(CH_2)_n$ lipids, *Firmicutes* with VLDL/LDL and $(CH_2)_n$ lipids, and positive correlation between *Verrucomicrobia* and isoleucine, *Firmicutes* with isoleucine and BCAA. In SG there was positive correlation between *Bacteroidetes* and glycerol, and negative correlation between body fat mass, glutamine and arginine. Fifteen days after the end of the intervention, PG showed increase in γ-*Proteobacteria*, compared to the other groups and times, and lower calorie (T0:1791.88 ± 613.35 vs. T75:1254.81 ± 358.76, p=0.027) and carbohydrate intake (PG:46.10±10.61 vs. SG:62.76±13.54, p=0.040), compared to baseline and SG, respectively. Probiotic associated to low-calorie diet for 60 days decreased triglycerides and metabolites associated to lipids. While, symbiotic furthers discreet weight loss, increased in *Verrucomicrobia*, and greater changes in host metabolism.

Keywords: obesity, probiotic, symbiotic, *Bifidobacterium lactis*, fructooligosaccharide, weight loss, lipemia, glycemia, blood pressure, gut microbiota, metabolomic.

Sumário

1. Introdução 19
2. Referencial teórico 21
2.1. Obesidade e comorbidades 21
2.2. Composição, papel da microbiota intestinal no organismo e sua regulação 24
2.3. Microbiota intestinal e obesidade 32
2.4. Modulação da microbiota no tratamento da obesidade e comorbidades 36
2.5. Metabolômica na obesidade 45
3. Justificativa 48
4. Objetivos 49
4.1. Objetivo geral 49
4.2. Objetivos específicos 49
5. Métodos 50
5.1. Considerações éticas 50
5.2. Casuística 50
5.3. Desenho do estudo 50
5.3.1. Intervenção 52
5.3.2. Avaliação do consumo alimentar 53
5.3.3. Avaliação da atividade física 54
5.3.4. Avaliação de efeitos colaterais da suplementação 54
5.3.5. Variáveis antropométricas e pressão arterial 55
5.3.6. Variáveis laboratoriais 56
5.3.7. Análise da microbiota por meio das fezes 56
5.3.7.1. Extração e avaliação da qualidade do DNA 57
5.3.7.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) 57
5.3.8. Metabolômica exploratória 59
5.3.8.1. Preparo da amostra de soro 59
5.3.8.2. Análise metabolômica por RMN 59
5.3.9. Análises estatísticas 61
6. Resultados 62
6.1. Manuscrito 1 62
6.2. Manuscrito 2 84
7. Considerações finais 104
8. Referências bibliográficas 105

Lista de anexos

Anexo I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro	126
Anexo II: Registrodo estudo no *Clinical Trial*	129
Anexo III: Questionário Internacional de Atividade Física forma curta	130
Anexo IV: Escala de Bristol	132
Anexo V: Questionário de avaliação dos sintomas gastrointestinais	133
Anexo VI: Especificações do FOS	134
Anexo VII: Registro alimentar de 3 dias	135
Anexo VIII: Artigos publicados durante o doutorado	136

Lista de apêndices

Apêndice I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 140

Apêndice II: Questionário de dados gerais 143

Apêndice III: Questionário de freqüência alimentar (QFA) 148

Apêndice IV: Orientações para preenchimento do registro alimentar de 3 dias 149

Apêndice V: *Checklist* do registro alimentar de 3 dias 150

Apêndice VI: Protocolo para avaliação antropométrica 151

Apêndice VII: Protocolo para avaliação da composição corporal 153

Apêndice VIII: Protocolo para medida da pressão arterial (PA) 154

Apêndice IX: Protocolo de preparo de amostra e análise de metabolômica 156

Lista de siglas e abreviações

AACR – aminoácidos de cadeia ramificada

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

AGI – ácidos graxos insaturados

AGL – ácidos graxos livres

AGMI – ácidos graxos monoinsaturados

AGPI – ácidos graxos poli-insaturados

AGS – ácidos graxos saturados

AMPK – *adenosine monophosphate-activated protein knase* (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato)

ANGPTL4 – *angiopoietin-like 4* (proteína semelhante à angiopoietina 4)

B. lactis – *Bifidobacteriumlactis*

BCATm - *mitochondrial branched chain amino acid aminotransferase* (animotransferase de aminoácido de cadeia ramificada mitocondrial)

BCKD - *branched-chain α-ketoacid dehydrogenas*e (α-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada)

BIA – bioimpedância elétrica

CB1 – receptor endocanabinoide 1

CB2 – receptor endocanabinoide 2

CCK – colecistoquinina

CD4 – *clusterdifferentation 4* (grupamento de diferenciação 4)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

ChREBP– *carbohydrate-responsive element-binding protein* (proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos)

cm – centímetro

CT – colesterol total

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DM2 – diabetes *mellitus* tipo 2

DNA – *deoxyribonucleicacid* (ácido desoxirribonucléico)

eCB – *endocannabinoid* (endocanabinoide)

ENDEF – Estudo Nacional de Despesa Familiar

ESPEN – *European Society for Pareteral and Enteral Nutrition*

Fiaf – *fasting-inducedadipocytefactor* (fator adipocitário induzido pelo jejum)

FOS – frutooligossacarídeo

FXR – *farnesoid Xreceptor* (receptor farnesóide X)

g – gramas

GABA – *gamma-aminobutyric acid* (ácido gama-aminobutírico)

GC – grupo controle

GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* (peptídeo como glucagon 1)

GOS – galacto-oligossacarídeo

GPCR109A – *G proteincoupledreceptors*109A (receptores acoplados a proteína G109A)

GPCR41 – *G proteincoupledreceptors*41 (receptores acoplados a proteína G41)

GPCR43 – *G proteincoupledreceptors*43 (receptores acoplados a proteína G43)

GP – grupo probiótico

GS – grupo simbiótico

^{1}H – hidrogênio isótopo 1

HbA1c – hemoglobina glicada

HDL-c – *high density lipoprotein cholesterol* (lipoproteína de alta densidade colesterol)

HOMA-IR – *Homeostasis Model Assessment Resistance Insulin*

IMPG – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes

INJC – Instituto de Nutrição Josué de Castro

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

IL-10 – interleucina 10

IMC – índice de massa corporal

IPAQ – *International physical activity questionnaire* (questionário Internacional de Atividades Físicas)

kg – quilogramas

kg/m² – quilogramas por metro quadrado

L. – *Lactobacillus*

LACFAR – Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia

LANUTRI – Laboratório de Avaliação Nutricional

LDL – *lowdensitylipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

Loading – PLS-*regression corfficients* (coeficientes de regressão PLS)

LPL – lipoproteína lipase

LPS – lipopolissacarídeo

m² – metros ao quadrado

MGC – massa gorda corporal

mg/dL – miligramas/decilitro

MHz – mega-hertz

ml – mililitros

MLG – massa livre de gordura

mmHg – milímetros de mercúrio

NKT – *natural killer T cells* (células exterminadoras natural T)

NTC – *Non-TemplateControl*

Olfr78 – *olfactoryreceptors*78 (receptores olfativos 78)

PA – pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica

PAS – pressão arterial sistólica

PC – perímetro de cintura

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

PCR – proteína C reativa

PLS-DA – *Partial Least Square-Discriminant* (Análise Parcial Mínima de Discriminação Quadrática)

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

POMC – pró-opiomelanocortina

PYY – peptídeo YY

QFA – questionário de frequência alimentar

QUICKI – *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*

RI – resistência à insulina

RMN – ressonância magnética nuclear

RT-PCR – *real-time polymerase chain reaction* (reação em cadeia de polimerase em tempo real)

SBCBM– Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica

SREBP-1– *sterol regulatory element-binding proteins*1 (proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1)

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

TA – tecido adiposo

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TG – triglicerídeo

TGI – trato gastrointestinal

TGR5 – *Takeda-G protein receptor* (receptor de ácido biliar ligado à membrana plasmática 5)

TLR-4 – *toll-like receptor* 4 (receptor tipo Toll 4)

TLR-5 – *toll-like receptor* 5 (receptor tipo Toll 5)

TLR-9 – *toll-like receptor* 9 (receptor tipo Toll 9)

TNF-α – *tumoral necrosisfactor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

UFC – unidade formadora de colônia

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

USDA– *United States Department of Agriculture*

VET – valor energético total

VIP - *variable importance in the projection* (variáveis importantes na projeção)

VLDL-c – *very-low density lipoprotein cholesterol* (lipoproteína de muita baixa densidade colesterol)

WHO – *World Health Organization*

1. Introdução

Obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura corporal, ocasionada por um desequilíbrio energético (WHO, 2018). Aproximadamente 13% da população adulta mundial está com obesidade (WHO, 2018), e no Brasil 19,8% dos adultos estão com obesidade, sendo mais prevalente no sexo feminino (BRASIL, 2019).

Esta enfermidade é fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como: diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia, doenças cardiovasculares, desordens músculos-esqueléticas e alguns tipos de câncer (ABESO, 2016; WHO, 2018). Trata-se de uma doença complexa e multifatorial, sendo, por isso, considerada de difícil controle e motivo de preocupação global. Dentre as causas da doença podem ser citadas fatores genéticos, ambientais, psicológicos (COUTINHO, 1998; ABESO, 2016), além da interferência da microbiota intestinal (ANGELAKIS *et al*., 2012), dentre outros.

A microbiota intestinal do indivíduo obeso tem a razão *Fimicutes*/*Bacteroidetes* aumentada, o que parece estar associado ao ganho de peso corporal (LEY *et al*., 2006; ISMAIL *et al*., 2011; KASAI *et al*., 2015; LOUIS *et al*., 2016; KOLIDA *et al*., 2017; CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020). Este desequilíbrio na composição da microbiota intestinal favorece a absorção de nutrientes energéticos ingeridos e armazenamento de triglicerídeos (TG) em tecido adiposo (TA), aumenta a permeabilidade da barreira intestinal, o que gera a endotoxemia metabólica e inflamação, processos estes associados à resistência à insulina (RI) e desenvolvimento de outras morbidades da obesidade (CANI, 2012; CARVALHO; SAAD, 2013; EVERARD *et al*., 2013; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; MUSCOGIURI *et al*., 2019).

A interação da microbiota intestinal com o hospedeiro tem sido estudada por meio da metabolômica, a fim de entender a influência que a microbiota pode exercer sobre o funcionamento do organismo do hospedeiro (MATSUMOTO *et al*., 2012). O estudo do perfil de metabólitos de baixo peso molecular de fluidos biológicos como soro/plasma e urina visa compreender as alterações metabólicas que ocorrem em indivíduos com obesidade, abrangendo o entendimento dos mecanismos da doença (TSUTSUI *et al*., 2011).

Estudos vêm mostrando diferenças no perfil metabólico dos indivíduos com obesidade comparada aos eutróficos, sendo correlacionado positivamente o índice de massa corpoal (IMC) com aumento nas concentrações de aminoácidos de cadeia

ramificada (AACR) e glutamato (MORRIS *et al.*, 2012; LIU et al., 2017). A microbiota intestinal parece ter papel crucial sobre o metabolismo do hospedeiro, sendo um caminho pelo qual leva a alterações associadas à obesidade (LIU *et al*., 2017).

Neste contexto, a microbiota intestinal pode ser modulada por prebiótico, probiótico e simbiótico (PANDEY *et al*., 2015), promovendo alteração na sua composição, resultando na regeneração da barreira intestinal e, com isso, cessando a endotoxemia metabólica e a inflamação de baixo grau. Além disso, possuem efeitos sobre a modulação do sistema imunológico, regulando a produção de citocinas pro e anti-inflamatórias, reduzindo a RI (CARVALHO; SAAD, 2013; PANWAR *et al*., 2013). Por meio destes mecanismos, os probióticos e os simbióticos alteram o perfil da microbiota dos indivíduos levando à perda de peso corporal e parâmetros metabólicos associados à obesidade (WANG *et al*., 2015).

Vários estudos vêm mostrando efeitos benéficos do probiótico e simbiótico sobre o peso corporal, controle glicêmico, melhora do perfil lipídico e pressão arterial (PA) (DONG *et al*., 2013; ESLAMPARAST *et al*., 2014; KHALESI *et al*., 2014; RABIEI; SHAKERHOSSEINI; SAADAT, 2015; ZHANG; WU; FEI, 2015; HE; ZHANG; HAN; 2017; BORGERAAS *et al*., 2018). Porém, alguns estudos mostram resultados controversos (MILLION *et al*., 2012b; PEÑA *et al*., 2014; IVEY *et al*., 2014 e 2015; PARK; BAE; 2015; CROVESY *et al*., 2017). Por isso, os mecanismos pelos quais a modulação da microbiota intestinal afeta o metabolismo do hospedeiro precisam ser estudados. Não há registro na literatura de estudo do perfil metabolômico de indivíduos submetidos à intervenção com probiótico ou simbiótico no tratamento da obesidade.

2. Referencial teórico

2.1. Obesidade e comorbidades

A obesidade é definida como o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal que pode trazer prejuízo à saúde (WHO, 2018). É uma doença que tem se tornado motivo de preocupação global devido a sua prevalência elevada e aumento crescente a nível mundial (GBD 2015 ObesityCollaborators, 2017; WHO, 2018).

Desde a década de 1980 é possível observar um aumento maior que o dobro na prevalência de obesidade no mundo. Em 2014, cerca de 600 milhões (13 %) de adultos no mundo estavam com obesidade, sendo 11 % dos homens e 15 % das mulheres (GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017; WHO, 2018). Mais da metade dos casos de obesidade estão distribuídos entre Estados Unidos da América, China, Índia, Rússia e Brasil (Ng *et al*., 2014).

No Brasil, a prevalência de obesidade na década de 1970 era de 2,8 % em homens e 8 % em mulheres (ENDEF, 1978), passando para 12,5 % e 16,5 % em 2008-2009, para homens e mulheres respectivamente (BRASIL, 2010). Dados do ano de 2016 mostravam que a doença atingia 18,9 % dos adultos brasileiros, sendo 18,1 % dos homens e 19,6 % das mulheres (BRASIL, 2017). Dados mais recentes informam que o número de indivíduos adultos com obesidade chegou à 19,8 %, sendo 20,7 % das mulheres e dos 18,7 % de homens (BRASIL, 2019).

Sua etiologia é complexa e multifatorial, oriunda da interação entre fatores genéticos, ambientais, psicológicos, anomalias endócrinas (síndrome de Cushing, hipotireoidismo, deficiência do hormônio do crescimento, hiperinsulinemia, síndrome dos ovários policísticos, hipogonadismo), alguns fármacos (antidepressivos tricíclicos, antipsicóticos, benzodiazepínicos, sulfoniluréias, corticóides, antiepiléticos, insulina ou hipoglicemiantes orais) (COUTINHO, 1998; GUEDES *et al*., 2005; VARELA-MOREIRA *et al*., 2013; ABESO, 2016) e da interferência da microbiota intestinal (ANGELAKIS *et al*., 2012).

O diagnóstico da obesidade é feito por meio do IMC que é calculado pelo peso corporal em quilogramas (kg) dividido pela altura em metros ao quadrado (m^2). Quando este valor é maior ou igual a 30 kg/m^2 é diagnosticada a obesidade. Esta pode ser dividida em três graus diferentes: I, IMC entre 30 e 34,9 kg/m^2; II entre 35 e 39,9 kg/m^2; e III $\geq$ 40 kg/m^2. Além do IMC, outras avaliações podem ser realizadas para verificar a quantidade e distribuição de gordura corporal, como o perímetro de cintura (PC), o qual está

relacionado ao risco de complicações metabólicas quando o valor é superior a 88 cm para mulheres e 102 cm para homens, e métodos para estimativa da massa magra e gorda dos indivíduos (WHO, 2000; SAMPAIO, 2012; ABESO, 2016). A associação do IMC com estas outras medidas antropométricas refletem de forma mais eficiente a distribuição da gordura corporal (HOU *et al*., 2013; PINTÉR *et al*., 2013).

A obesidade é fator de risco para o desenvolvimento de outras DCNT, tais como: doenças musculoesqueléticas, cardiovasculares, DM2, alguns tipos de câncer. Parece que há correlação positiva entre o IMC e a presença destas comorbidades (GUH *et al*., 2009; WHO, 2018), e associação entre gordura corporal aumentada e complicações metabólicas (SMITH *et al*., 2012; WHO, 2018), no qual o TA é o ponto central no desenvovlvimento das comorbidades, em conjunto ao excesso de ácidos graxos livres (AGL) e anomalias hormonais (BRAY *et al*., 2018).

O TA apresenta função endócrina além de estocar gordura corporal em seus adipócitos. Ele libera citocinas que tem ação parácrina, promovendo inflamação local, e endócrina levando a RI. A inflamação no TA recruta macrófagos gerando um ciclo de recrutamento destas células e produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR), que afetam fígado, sangue e o próprio TA, levando a inflamação crônica de baixo grau (LEE, 2013; MCARDLE *et al.*, 2013; PATEL *et al*., 2013). Além disso, há aumento de AGL, que por sua vez, pioram a sensibilidade à insulina e afetam alguns órgãos, gerando esteatose hepática, RI, hiperglicemia, dislipidemia e doenças cardiovasculares (BAYS *et al*., 2008; SERVÁN, 2013; JUNG; CHOI, 2014). As alterações encontradas no TA de indivíduos com obesidade são apresentadas na **Figura 1**.

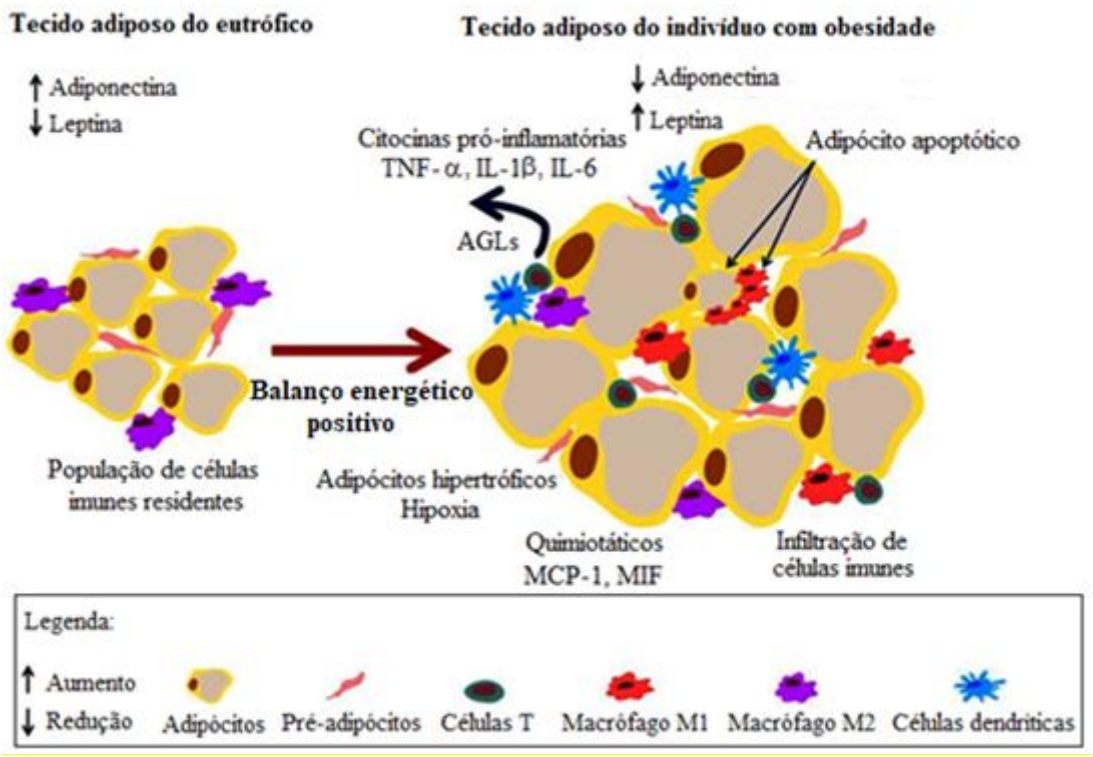


Figura 1. Alterações no tecido adiposo do indivíduo com obesidade

AGLs: ácidos graxos livres; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL-1β: interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; MCP-1: proteína de quimioatração de monócitos; MIF: fator de inibição de migração de mastócitos. Fonte: Adaptado de MCARDLE *et al.*, 2013.

O TA do indivíduo com obesidade é caracteridado pela inflamação, oriunda da ativação de células do sistema imune encontradas no TA, associadas a maior produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias e menor produção de fatores anti-inflamatórios.

Ademais, AGL em excesso são captados pelo fígado, aumentando a produção de TG e lipoproteínas de muita baixa densidade colesterol (VLDL-c) e inibindo a lipoproteína lipase (LPL) nos músculos e TA, culminando em hipertrigliceridemia. O VLDL-c, por sua vez, também contribui com aumento de TG por meio da inibição da lipólise dos quilomícrons. Também há redução de lipoproteínas de alta densidade colesterol (HDL-c) e aumento de lipoproteínas de baixa densidade colesterol (LDL-c) de menor densidade (KLOP *et al*., 2013; JUNG; CHOI, 2014), que são mais vulneráveis à oxidação, devido a sua maior facilidade em depositar-se na camada subendotelial, podendo culminar em aterosclerose (TABAS *et al*., 2007).

O tratamento da obesidade inclui mudança no estilo de vida, mudanças comportamentais, fármacos e cirurgia bariátrica e metabólica. A mudança no estilo de vida contempla modificação na dieta com restrição da ingestão calórica que varia entre

500 a 1000 kcal/dia, podendo haver redução do consumo de lipídios ou não, associado à atividade física, a fim de promover balanço energético negativo para gerar perda de peso corporal (ABESO, 2016; BRAY *et al.*, 2018). Ademais, na última versão da diretriz de obesidade foi destacada a importância de se modificar o comportamento do indivíduo com obesidade por meio da terapia cognitivo-comportamental, com a finalidade de alcançar os objetivos do tratamento, motivando o paciente para que não haja recaída durante o mesmo e recuperação de peso corporal (ABESO, 2016).

Alguns fármacos podem auxiliar na redução do peso corporal por meio de diferentes ações, podendo estes aumentar a saciedade, gerando menor consumo de alimentos e consequentemente calorias (sibutramina), reduzir a absorção de TG ingeridos, diminuindo a absorção de lipídios (orlistate), ou afetar o balanço energético nos centros de recompensa hipotalâmico, prolongando a saciedade (liraglutida). Além destas classes de fármacos permitidos no Brasil, podem ser prescritos medicamentos *off-label* (topiramato, fluoxetina, naltrexona, bupropiona, dimesilato de lisdexanfetamina), que não são específicos para tratar a obesidade, mas têm se mostrado efetivos quando as drogas convencionais não são bem-sucedidas (ABESO, 2016).

A cirurgia bariátrica e metabólica é a última alternativa de tratamento para obesidade empregada quando os demais tratamentos foram tentados sem sucesso. Ela é indicada para indivíduos com obesidade grau III, ou obesidade grau II que tenham a presença de comorbidades. Existem diferentes técnicas de cirurgia que são divididas em três grupos: restritivas, a qual há redução do tamanho do estômago, favorecendo a menor ingestão de alimentos; disabsortivas, a qual há desvio de parte do intestino, reduzindo assim à absorção de nutrientes; e as mistas que são a junção de ambas as técnicas, promovendo redução do estômago e da absorção de nutrientes (MECHANICK *et al.*, 2013; SBCBM, 2017). No Brasil apenas 4 técnicas são permitidas: banda gástrica ajustável, gastrectomia vertical (Sleeve), *bypass* gástrico em Y-de-Roux, derivação duodenal Switch e a técnica auxiliar do balão intragástrico (SBCBM, 2017).

2.2. Composição, papel da microbiota intestinal no organismo e sua regulação

Microbiota é o conjunto de microorganismos que habitam o corpo humano em uma relação de simbiose, na qual ambos se beneficiam desta associação (LOZUPONE *et al.*, 2012). Acreditava-se que cerca de 100 trilhões de bactérias habitavam o trato gastrointestinal (TGI) do hospedeiro, o que corresponderia à quase dez vezes o número de células que compõem o corpo humano (SAVAGE, 1997; BÄCKHED *et al.*, 2005).

Entretanto, em 2016, um grupo de pesquisadores revisou esta estimativa e conclui que a proporção de bactérias para células do hospedeiro é de aproximadamente 1:1, com um total de 10 trilhões de bactérias (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Estima-se que cerca de 1000 espécies bacterianas façam parte da microbiota intestinal humana (CLAESSON *et al*., 2009), e os principais filos os quais estas bactéria pertencem são *Firmicutes* (60-65%), *Bacteroidetes* (20-25%), seguidos, em menor quantidade, por *Proteobacteria* (5-10%), *Actinobacteria* (3%) e *Verrucomicrobia* (<1%) (ECKBURG *et al*., 2005; ARUMUGAM *et al*., 2011). *Firmicutes* e *Bacteroidetes* correspondem a cerca de 90% dos filos que compõem a microbiota intestinal humana (ECKBURG *et al*., 2005; ARUMUGAM *et al*., 2011). Na figura abaixo (**Figura 2**) encontra-se a distribuição de bactérias da microbiota ao longo do TGI.

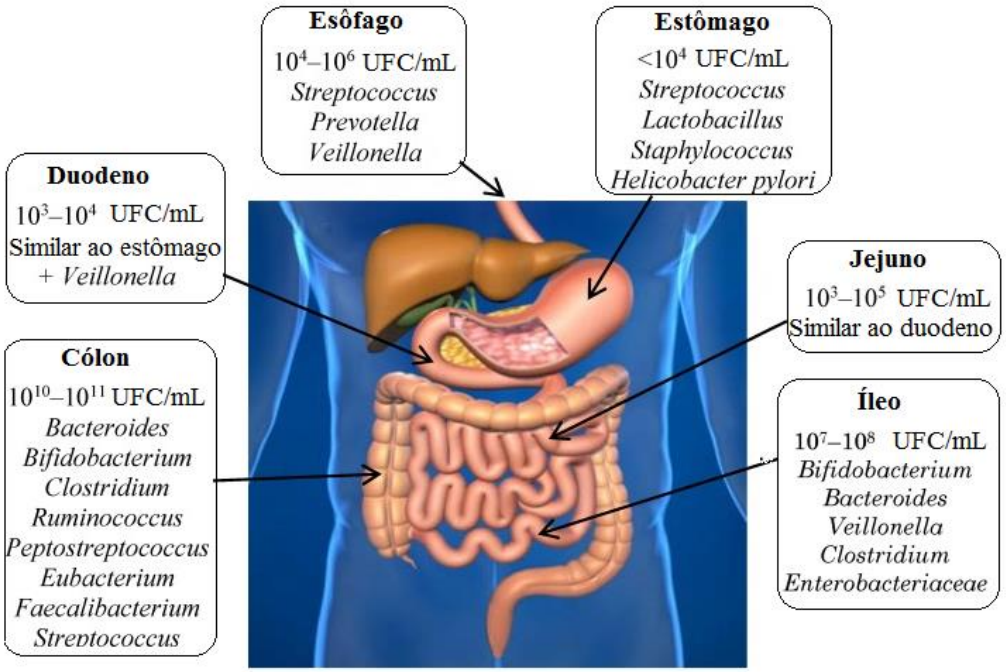


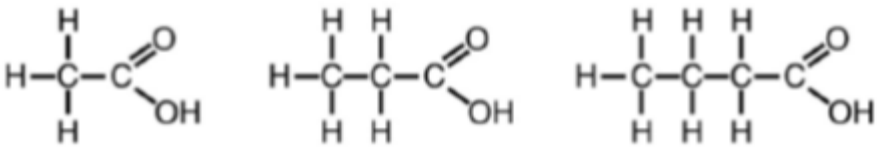
Figura 2. Composição da microbiota ao longo do trato gastrointestinal.
UFC: unidade formadora de colônia; mL: mililitro. Fonte: adaptada de Dueñas et al., 2015

O TGI é colonizado por bactérias que compõem a microbiota. Ao longo do TGI a diversidade microbioana é crescente, com maior quantidade e variedade no cólon.

A microbiota intestinal interage com seu hospedeiro e desempenha importante papel no seu metabolismo, podendo ser citados: produção de vitaminas do complexo B e K; biossíntese de aminoácidos; participação no metabolismo dos sais biliares e lipídios; fermentação de substratos não digeríveis, gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

que tem papel na regulação, diferenciação e crescimento de células epiteliais; manutenção da integridade das *tigh-junctions* e produção de muco, mantendo a barreira intestinal íntegra; colonização resistente e influência sobre a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, conferindo proteção contra agentes patógenos (PASCALE *et al.*, 2018); biotransformação de polifenóis encontrados nos alimentos consumidos pelo hospedeiro; além de atuarem na destoxificação do hospedeiro, metabolizando compostos xenobióticos e drogas ingeridas (JANDHYALA *et al*., 2015).

As bactérias interagem com o organismo do hospedeiro por meio dos AGCC, que são metabólitos resultantes da fermentação de polissacarídeos. Os AGCC são definidos como grupos de ácidos graxos que contém de um a seis carbonos na sua composição. Dentre eles podem ser citados: ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido valérico (RAGSDALE; PIERCE, 2008). Os AGCC encontrados em maior quantidade são: ácido acético (acetato), ácido propiônico (propionato) e ácido butírico (butirato), correspondendo a cerca de 95% dos AGCC produzidos pelas bactérias presentes na microbiota intestinal (RAGSDALE; PIERCE, 2008) (**Figura 3**). Acetato, propionato e butirato são encontrados na proporção de 70:20:10 no intestino (TOPPING; CLIFTON, 2001). Acetato é produzido a partir do piruvato por meio de acetil CoA ou de Wood-Ljungdahl, que consiste em um conjunto de reações bioquímicas realizadas por algumas bactérias e archaea (RAGSDALE; PIERCE, 2008), enquanto propionato é formado do succinato ou lactato via succinato e acrilato, respectivamente, e, por fim, o butirato é gerado pela combinação do acetil CoA e butiril Coa, além do acetato e lactato (KOH *et al*¸ 2016).



Acetato Propionato Butirato

Figura 3. Estrutura molecular dos AGCC produzidos pela microbiota intestinal. Fonte: Adaptado de Al-Lahham *et al.*, 2010

As concentrações detes ácidos variam no ceco e cólon, sendo estimada uma quantidade de 70 a 140 mM e 20 a 70 mM, respectivamente. Após serem absorvidos eles são utilizados pelas células do cólon, os colonócitos, e, também são transportados pelo

sangue para os demais órgãos do corpo (KOH *et al.*¸ 2016). Eles apresentam funções como nutriente para epitélio do cólon, modulam o pH intestinal e intracelular, modulam o volume celular e funções associadas ao transporte de íons, além de regular a proliferação, diferenciação e expressão gênica (WONG *et al*., 2006; PASCALE *et al.*, 2018).

O acetato é o principal AGCC, que é rapidamente absorvido e metabolizado pelo fígado, onde serve de substrato para síntese de colesterol e participa da lipogênese (WONG *et al*., 2006; PASCALE *et al.*, 2018; CHAKRABORTI, 2015; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019), e também está envolvido na saciedade pelo estimulo da secreção de hormônios anorexígenos pelas células intestinais e pela inibição da pró-opiomelanocortina (POMC) no hipotálamo, sendo protetor contra obesidade induzida por dieta (FROST *et al*., 2014; CHAKRABORTI, 2015; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Ademais, o acetato está envolvido na melhora da RI por estimular a secreção de insulina pelo pâncreas, aumentar a capacidade oxidativa no fígado e nos músculos esqueléticos via estímulo da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

O propionato é substrato para gliconeogênese hepática, inibe a síntese de colesterol hepático por meio da inibição da enzima acetil-CoA sintetase (WONG *et al*., 2006; AL-LAHHAM *et al.*, 2010; CHAKRABORTI, 2015) e também no TA por meio do estímulo da lipogênese e redução da lipólise (AL-LAHHAM *et al.*, 2010), aumenta a expressão de genes codificantes da leptina, estimula secreção de hormônios anorexígenos e adipocinas, tendo efeito protetor contra obesidade (AL-LAHHAM *et al.*, 2010; CHAKRABORTI, 2015), devido à redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, além disso, reduz a inflamação, reduzindo a RI (AL-LAHHAM *et al.*, 2010).

Já o butirato é utilizado como fonte de energia pelos enterócitos, tendo importante papel na apoptose, regulação e proliferação celular (WONG *et al*., 2006; PASCALE *et al.*, 2018; CHAKRABORTI, 2015), melhora função da barreira intestinal, prevenção de endotoxemia metabólica e ativação de gliconeogênese em células intestinais, participa da ativação da atividade mitocondrial, aumenta expressão gênica de codificantes da leptina e estimula secreção de hormônios anorexígenos pelas células intestinais (GAO *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2012; CHAKRABORTI, 2015). Maior atividade mitocondrial em associação ao aumento de leptina e hormônios anorexígenos contribuem com a perda de peso corporal e eutrofia (GAO *et al.*, 2009).

Os AGCC têm papel na modulação da resposta endócrina, imunológica e do sistema nervoso. Interação do propionato com receptores acoplados a proteína G41

(GPCR41) e GPCR43 nas células enteroendócrinas estimulam a secreção de peptideo YY (PYY) e peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), respectivamente, que são hormônios anorexígenos, promovendo a redução da ingestão alimentar. Ligação do AGCC ao GPCR43 aumenta secreção de insulina, o que melhora a sensibilidade à insulina e a resposta imune intestinal. AGCC interagindo com GPCR41 e GPCR43 presentes no TA estimulam a secreção de leptina, suprimem a sinalização da insulina e adipogênese, e elevam o gasto energético por meio do aumento da atividade do sistema nervoso simpático (LI; SHIMIZU; KIMURA, 2017; PASCALE *et al.*, 2018).

Propionato e butirato induzem gliconeogênese nas células intestinais, o que influência na regulação do consumo alimentar e aumenta a sensibilidade à insulina. Ademais interação de butirato com o GPCR109A expresso no intestino reduz inflamação intestinal mediado por IL-8 e IL-10, e no TA promove lipólise. Acetato e propionato podem regular a PA por meio da ligação nos receptores olfativos (Olfr78) localizados em vasos sanguíneos e renais (LI; SHIMIZU; KIMURA, 2017).

Cada indivíduo possui uma composição de microbiota intestinal única, e a sua formação depende de diversos fatores, que serão cruciais nos três primeiros anos de vida, momento em que a microbiota é estabelecida (RINNINELLA *et al.*, 2019). Dentre os agentes que influenciam a formação da microbiota podem ser citados fatores genéticos do hospedeiro, a saúde materna, o tipo de parto, tipo de aleitamento, introdução da alimentação e o uso de antibióticos e/ou probióticos (ECKBURG *et al*., 2005; EDWARDS, 2017; RINNINELLA *et al.*, 2019; VERDU; GALIPEAU; JABRI, 2015).

Recentemente descobriu-se que a genética do hospedeiro é capaz de determinar a formação da microbiota (DAVENPORT, 2016; GOODRICH *et al*., 2014) por meio de duas formas: alguns loci são capazes de controlar algumas espécies microbianas, e pelo efeito pleiotrópico putativo sobre grupos distintos de microorganismos (BENSON *et al*., 2010). Os genes do hospedeiro são capazes de exercer efeitos sobre determinadas bactérias, sofrendo maior influência aquelas que pertencem aos filos *Firmicutes e Proteobacterias* (DAVENPORT, 2016). Entretanto, alguns microorganismos parecem não sofrer efeitos da genética do hospedeiro, tais como os pertencentes ao filo *Bacteroidetes* (GOODRICH *et al*., 2014). Ademais, a genética humana pode influenciar a diversidade microbiana. Sabe-se que diversidade reduzida é associada ao desenvolvimento de obesidade e DM2 (BLEKMAN *et al*., 2015).

A predisposição genética para determinadas doenças, como por exemplo, a obesidade, poderia promover a formação de uma microbiota que contribuiria com o

processo de evolução desta enfermidade (BENSON*et al*., 2010). Apesar de a genética do hospedeiro ter papel na formação da microbiota intestinal, parece que os fatores ambientais têm maior influência sobre microbiota (DAVENPORT, 2016).

A microbiota se inicia na vida intra-uterina por meio da migração das bactérias do microbioma intestinal materno para o feto, especialmente no último mês de gestação. Estas conseguem atravessar a placenta, alcançando o líquido amniótico, chegando até o bebê (RAUTAVA *et al*., 2012). Neste momento o estado nutricional, imunológico e metabólicoda mãe é crucial para a determinação de uma microbiota adequada para a criança (RAUTAVA *et al*., 2012; EDWARDS, 2017).

Outros pontos críticos na formação da microbiota são o parto e aleitamento. Durante o parto normal, os hormônios secretados contribuem com o aumento da permeabilidade da barreira intestinal, promovendo a passagem das bactérias da microbiota materna para corrente sanguínea e, consequentemente, alcançando o bebê (RAUTAVA *et al*., 2012). Estudos mostram diferenças na composição na microbiota intestinal de crianças que nasceram via parto vaginal comparadas com aquelas que nasceram por cesariana (RAUTAVA *et al*., 2012; BÄCKHED *et al*., 2015; RUTAYISIRE *et al*., 2016). Parece que a falta de contato com a microbiota vaginal materna predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de algumas doenças ao longo da vida, como a obesidade (RAUTAVA *et al*., 2012).

Uma revisão sistemática objetivou avaliar a formação da microbiota intestinal de bebês durante o primeiro ano de vida de acordo com o tipo de parto, cesariana ou vaginal. As crianças nascidas por cesariana tiveram quantidade e diversidade menores nos filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, especialmente nos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, respectivamente, e maiores em *Firmicutes* (*Clostridium* e *Lactobacillus*) até 90 dias após o parto, comparado às crianças que nasceram por parto normal (RUTAYISIRE *et al*., 2016).

Tun *et al*. (2018) também observaram a influência do parto cesárea sobre a composição da microbiota intestinal, levando ao enriquecimento no filo *Firmicutes*, que está associado à promoção de excesso de peso corporal nos bebês. Ademais as crianças que nasceram por parto vaginal tiveram menor risco para sobrepeso e obesidade. Os autores afirmam que o parto cesáreo pode ser fator de risco para obesidade por meio da microbiota (TUN *et al*., 2018).

Sabe-se que a microbiota materna também é transmitida para o feto via o leite materno (RAUTAVA *et al*., 2012; EDWARDS, 2017). Um estudo observou que o leite

de mães obesas tem menor diversidade de bactérias do que o das eutróficas e, o tipo de parto parece exercer influência sobre esta composição. Entretanto, quando as mulheres foram submetidas ao parto cesárea de emergência esta diferença se perdeu, apresentando um leite semelhante ao das mães submetidas ao parto normal (CABRERA-RUBIO *et al*., 2012). Além de conter microbiota materna, o leite materno também contém oligossacarídeos, que contribuem com o crescimento de bactérias bifidogênicas na microbiota do bebê (CABRERA-RUBIO *et al*., 2012; KOLEVA; BRIDGMAN; KOZYRSKYJ, 2015).

Crianças amamentadas com leite materno tendem a ter uma microbiota mais rica em bactérias pertencentes ao filo *Actinobacteria*, especialmente do gênero *Bifidobacterium*, enquanto aquelas que usam fórmula infantil têm a composição mais semelhante a de um adulto, com maior diversidade e proporção dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* (LEE *et al*., 2015). A importância de ter o desenvolvimento adequado da microbiota está intimamente relacionada ao desenvolvimento imune adequado, o que pode prevenir o desenvolvimento de doenças metabólicas (DOGRA *et al*., 2015; KOLEVA; BRIDGMAN; KOZYRSKYJ, 2015).

Uma vez estabelecida, a microbiota será mantida até a vida adulta, podendo sofrer alterações temporárias do ambiente externo. Ao longo da vida a microbiota sofre alterações, aumentando a sua diversidade a partir da introdução alimentar na infância (BÄCKHED *et al*., 2015; EDWARDS, 2017). A dieta tem destaque na manutenção da microbiota intestinal saudável, garantindo maior diversidade ou, promovendo o desequilibrio nas bactérias do microbioma. Tem sido demonstrado que a dieta hiperlipídica é associada à redução da diversidade da microbiota intestinal (FAVA *et al*., 2013), disbiose com aumento de *Firmicutes* e *Proteobacterias* e redução de *Bacteroidetes* (HILDEBRANDT *et al.*, 2009), endotoxemia metabólica e RI (CLEMENTE-POSTIGO *et al.*, 2012).

Além disso, a qualidade dos lipídios da dieta parece exercer diferentes influências sobre a microbioma intestinal, podendo ajudá-la ou prejudicá-la (CÂNDIDO *et al*., 2018). Desta forma ácidos graxos saturados (AGS) parecem ter efeitos negativos sobre a microbiota, causando desequilíbrio, pormovendo aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica (ARAÚJO *et al*., 2017). Em contra-partida, os ácidos graxos insaturados (AGI), mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) n-3, parecem beneficiar a microbiota intestinal e regular a inflamação (CÂNDIDO *et al*., 2018). Ademais, é importante manter um consumo adequado da relação de AGPI n-6:n-3, pois se esta estiver

elevada, como no padrão da dieta ocidental, pode causar aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica (KALIANNA *et al.*, 2015).

A proteína também vem recebendo destaque por sua capacidade em modular a microbiota do hospedeiro de acordo com a qualidade e quantidade ingerida (MA *et al*., 2017). Consumo excessivo de proteínas pode gerar proteínas residuais no intestino, o que promove alteração na composição da microbiota, contribuindo para o aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica (MA *et al.*, 2017).

A fonte alimentar da proteína também exerce efeitos diversos na microbiota e saúde do hospedeiro. Produtos lácteos e proteínas de fontes vegetarianas parecem ser benéficas à saúde, enquanto frutos do mar contêm aminoácidos aromáticos e poluentes orgânicos persistentes que influenciam negativamente a microbiota, produção de sais biliares e sistema endocanabinoide. Já as demais fontes de carne são ricas em AGS, AGPI n-6 e poluentes orgânicos persistentes, que tem impacto negativo sobre a microbiota e saúde do hospedeiro (MADSEN *et al.*, 2017). Além disso, a degradação de proteínas, principalmente fontes de colina, pelas bactérias comensais intestinais, podem produzir um composto chamado N-óxido de trimetilamina, que parece ter relação com o desenvolvimento de RI e doenças cardiovasculares (OELLGAARD *et al*., 2017).

Outro componente dietético que merece destaque é a fibra, pois dependendo da quantidade consumida pode favorecer ou prejudicar a microbiota intestinal. A dieta rica neste nutriente modula o microbioma favorecendo o crescimento de bactérias benéficas e produção de metabólitos importante que refletem de forma positiva na saúde do hospedeiro (MAYENGBAM *et al.*, 2019; SAWICKI *et al*., 2017). Por outro lado, o baixo consumo reduz bactérias fermentadoras de fibra, levando ao aumento de micro-organismos que degradam o muco, promovendo a destruição deste, o que permite que bactérias patógenas alcancem a barreira intestinal e atravessem a mesma (DESAI *et al.*, 2016).

A idade também parece exercer efeitos sobre a microbiota. Estudos mostram que o idoso apresenta redução na diversidade de bactérias que compõem a microbiota com redução em especial no filo *Firmicutes*, o que tem sido associado ao risco metabólico (KRUMAR *et al*., 2016; CHOI; HUR; HONG, 2018).

Devido ao fato de a microbiota ter grande importância no processo de saúde e doença, é crucial a garantia da formação adequada da microbiota nos primeiros anos de vida, a fim de garantir o amadurecimento adequado da microbiota e minimizar os riscos

para doenças imunológicas e metabólicas (KOLEVA; BRIDGMAN; KOZYRSKYJ, 2015; VERDU; GALIPEAU; JABRI, 2015).

2.3. Microbiota intestinal e obesidade

O primeiro estudo sobre microbiota na obesidade foi conduzido por Bäckhed *et al*. (2004) e publicado em 2004, o qual foi realizado transplante de microbiota intestinal de ratos convencionais para ratos *germ-free* e verificou-se que os ratos que receberam o transplante fecal tiveram aumento de 40% na gordura corporal e RI. A partir de então o número de estudos sobre a composição da microbiota intestinal no indivíduo com obesidade começaram a aumentar.

Ley *et al*. (2005) publicaram o primeiro estudo que visou avaliar a diferença entre a composição da microbiota de animais obesos e não obesos, no qual camundongos geneticamente obesos (ob/ob) com deficiência no receptor de leptina apresentavam redução de 50% em *Bacteroidetes* e aumento de 50% em *Firmicutes* em comparação com os camundongos convencionais.

Em concordância com este achado em modelo animal, diversos estudos vêm apontando que a microbiota intestinal do indivíduo com obesidade apresenta relação *Firmicutes*/*Bacteroidetes* aumentada comparada com indivíduos eutróficos, na qual a proporção que aumenta *Firmicutes* reduz *Bacteroidetes*, (LEY *et al*., 2006; ISMAIL *et al*., 2011; KASAI *et al*., 2015; LOUIS *et al*., 2016; KOLIDA *et al*., 2017; CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020). Porém, alguns trabalhos mostram resultados opostos na razão *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, estando a redução desta associada com a gênese da obesidade (SCHWIERTZ *et al*., 2010; ARUMUGAM *et al*., 2011; KOCELAK *et al*., 2013). Uma metanálise objetivou verificar a correlação entre a razão *Firmicutes/Bacteroidtes* e a obesidade, concluindo que a proporção entre estes dois filos da microbiota não é capaz de diferenciar humanos com obesidade e eutrofia (WALTERS; XU; KNIGHT, 2014), entretanto, revisão sistemática realizada pelo grupo de pesquisa observou que aumento na razão *Firmicutes/Bacteroidetes* tem relação com a obesidade (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020). Além destes dois filos, *Fusobacteria* e *Proteobacteria* também tiveram associação com a doença (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020).

A nível de gênero, alguns estudos mostram que algumas bactérias são associadas à doença. Indivíduos com obesidade tem maior quantidade de *Lactobacillus reuteri* e menor de *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus casei*, *Methanobacteria smitthi*

(MILLION *et al*., 2012a; MILLION *et al*., 2013), *Echerichia coli* (MILLION *et al*., 2013), *Faecalibacterium prausnitzii* e *Akkermansia muciniphila* (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020). Porém *Lactobacillus casei* e *Akkermansia muciniphila* foram associados ao peso adequado, e a combinação entre redução de *Bifidobacterium animalis* e aumento de *Lactobacillus reuteri* foi associada à obesidade (MILLION *et al*., 2012Aa; MILLION *et al*., 2013; CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020).

Devido à alteração na composição da microbiota intestinal do indivíduo com obesidade, a produção de AGCC pelas bactérias fica elevada por conta da maior fermentação de carboidratos, proporcionando um aumento na permeabilidade intestinal e interação diferente destes metabólitos com o organismo do hospedeiro, culminando em adiposidade excessiva e fatores de risco cardiometabólicos (SCHWIERTZ *et al*., 2010; LI; SHIMIZU; KIMURA, 2017; DE LA CUESTA-ZULUAGA *et al.*, 2019; MUSCOGIURI *et al*., 2019). Há modificação na sinalização dos GPCR por meio dos AGCC, levando a menor secreção de hormônios anorexígenos (PYY e GLP-1), culminando na maior ingestão alimentar, o que contribui com o ganho de peso corporal (CARVALHO e SAAD, 2013; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016).

Os AGCC, especialmente butirato e acetato, são capazes de estimular a expressão de mucinas nas células caliciformes do epitélio intestinal, que são responsáveis pela secreção de muco, um importante elemento na preservação da integridade da barreira intestinal. Com alteração no microbioma, a produção de muco fica comprometida, podendo prejudicar a barreira intestinal (CARVALHO; SAAD, 2013).

A produção aumentada de lipopolissacarídeos (LPS) pelas bactérias da microbiota também está associada à obesidade. Há redução na expressão e atividade das proteínas *tigh junction* zonula ocludente 1 e ocludina, que tem a função de manter as células intestinais juntas, preservando a barreira intestinal. A redução das *tigh junction* promove a elevação da permeabilidade da mucosa do intestino e conseqüente endotoxemia metabólica (CANI *et al*., 2007; CARVALHO; SAAD, 2013; CHAKRABORTI, 2015; SUN *et al.*, 2018; MUSCOGIURI *et al*., 2019). LPS interagem com receptores tipo toll 4 (TLR4), TLR 5 e TLR 9, ativando uma cascata enzimática que culmina na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α, IL-6 e IL-1β, que estão envolvidas na gênese da obesidade e suas morbidades (CANI *et al*., 2007; CHAKRABORTI, 2015; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; SUN *et al.*, 2018). O aumento das concentrações séricas deste metabólito, afetando principalmente TA, músculo, hipotálamo e fígado, provoca recrutamento de macrófagos e redução da sensibilidade à

insulina, favorecendo a RI. No hipotálamo, RI reduz a saciedade, promovendo maior consumo de alimentos (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; CARVALHO; SAAD; 2013; EVERARD; CANI, 2012; CHAKRABORTI, 2015; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; MUSCOGIURI *et al*., 2019) (**Figura 4**).

Parece que a microbiota intestinal se comunica com o TA, também, por meio do sistema endocanabinoide. Este sistema é composto por lipídios bioativos, tais como N-araquidonoiletanolamina e 2-araquidonoilglicerol, que se ligam aos receptores endocanabinoides 1 (CB1) e CB2. Endocanabinoides (eCB) são degradados por enzimas específicas, e quando há desbalanço entre a síntese e degradação neste sistema pode levar à obesidade e DM2 (LAMBERT; MUCCIOLI, 2007). O indivíduo com obesidade apresenta funcionamento do sistema eCB exacerbado, com aumento da expressão de receptores CB1, o que contribui para o aumento de gordura corporal (GEURTS *et al*., 2014) (**Figura 4**).

Os eCB, principalmente o CB1, parecem estar envolvidos na permeabilidade intestinal, contribuindo com a translocação de LPS e endotoxemia metabólica, e esta por sua vez, promove aumento do sistema eCB, gerando um ciclo (GEURTS *et al*., 2014; CANI, 2012). Em associação, sistema eCB e LPS regulam a adipogênese, contribuindo com o acúmulo de gordura no TA (MUCCIOLI *et al*., 2010; CANI, 2012) (**Figura 4**).

Além disso, a microbiota do indivíduo com obesidade parece ser mais eficiente em extrair nutrientes energéticos dos alimentos, por meio da digestão eficiente dos polissacarídeos dietéticos que não são digeridos pelo hospedeiro (TURNBAUGH *et al*., 2006; SUN *et al.*, 2018), culminando, assim, em maior absorção AGCC, os quais podem participar da lipogênese hepática de novo mediado por proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (ChREBP) e proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), contribuindo com o acúmulo de gordura no TA e fígado, e consequentemente, com a obesidade (KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; SUN *et al.*, 2018) (**Figura 4**).

Ademais, ocorre a supressão do fator adipocitário induzido pelo jejum (fiaf), também conhecido como proteína semelhante à angiopoietina 4 (ANGPTL4), que regula a LPL no TA e músculos. A LPL passa a ter alta atividade, aumentando a capitação de AGL e estoque de TG no TA, promovendo a adiposidade (BÄCKHER *et al*., 2004; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; CARVALHO; SAAD, 2013; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016). Há também a supressão de AMPK, que está envolvida na regulação do metabolismo energético, no fígado e músculos, levando a

redução da oxidação de ácidos graxos, favorecendo a deposição de gordura e RI nestes órgãos (BÄCKHED *et al*., 2007; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; SUN *et al.*, 2018) (**Figura 4**).

A produção de ácidos biliares também é outro mecanismo que pode contribuir com a obesidade. Eles funcionam como sinalizadores, que ativam receptor farnesóide X (FXR) e receptor de ácido biliar ligado à membrana plasmática 5 (TGR5), que têm papel crucial na regulação do metabolismo de lipídios e carboidratos no fígado e, consequentemente, no metabolismo energético (SWANN *et al*., 2011; KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016). A microbiota alterada pode modificar a sinalização do FXR, favorecendo adiposidade por meio da ativação da SREBP-1 no fígado, contribuindo com a lipogênese (WEISS; HENNET, 2017; SUN *et al.*, 2018). Ademais interação da microbiota com a síntese e conjugação de sais biliares pode conferir maior poder de emulsificação, promovendo maior absorção de lipídios e, consequentemente de calorias (SWANN *et al*., 2011) (**Figura 4**).

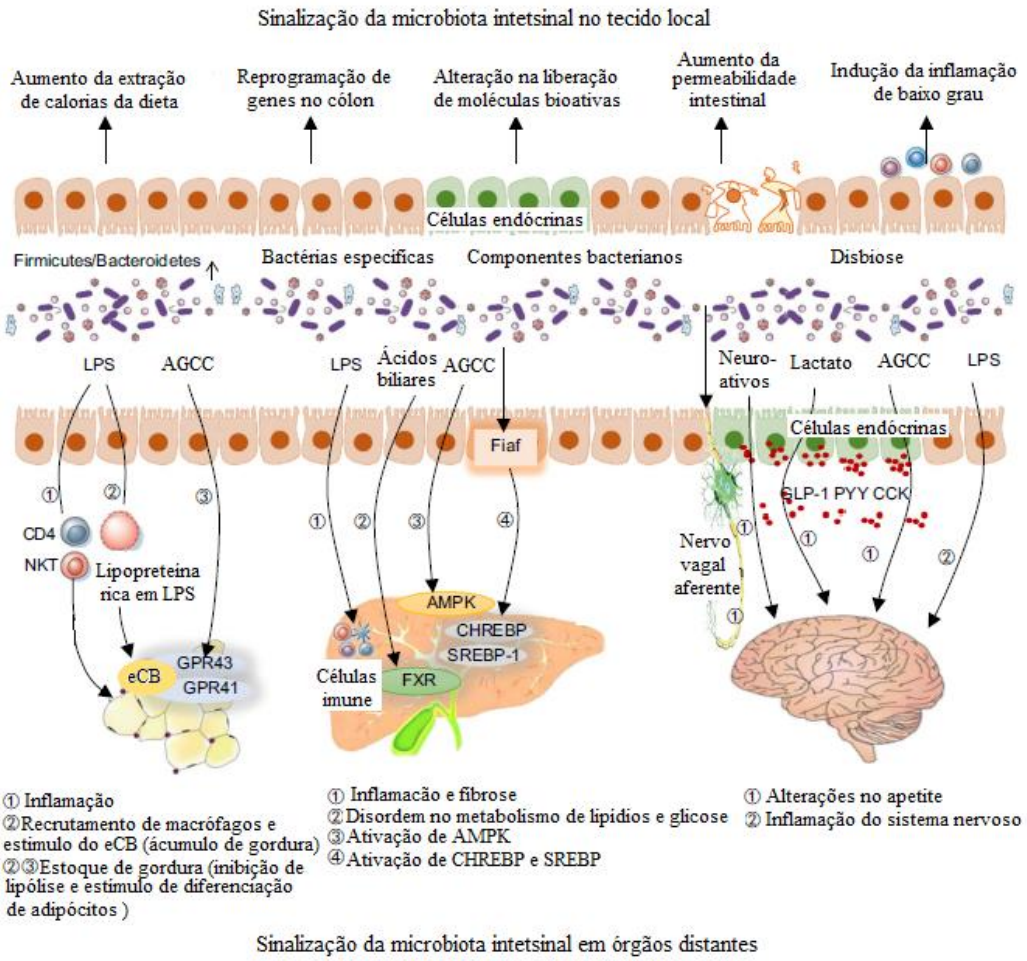


Figura 4. Mecanismo da disbiose na gênese da obesidade.

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; CCK: colecistoquinina; CD4: grupamento de diferenciação 4; CHREBP: proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos; eCB: endocanabinoide; FXR: receptor farnesóide X; GLP-1: peptídeio como o glucagon 1; GPR41: receptores acoplados a proteína G41; GPR43: receptores acoplados a proteína G43; LPS: lipopolissacarídeo; NKT: células exterminadora natural T; PYY: peptídeo YY; SREBP: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1. Fonte: Adaptado de Sun *et al*., 2018

A disbiose encontrada no indivíduos obeso favorece a absorção de nutrientes energéticos dos alimentos ingeridos, promove aumento da permeabilidade da barreira intestinal, endotoxemia metabólica (inflamação) via LPS no tecido adiposo, fígado e cérebro, perturbando o metabolismo de lipídeos, glicose e o sistema eCB, favorecendo o estoque de gordura corporal em adipócitos, além de alterar a secreção de hormônios anorexígenos (GLP-1 e PYY), contribuindo com menor saciedade. Estas alterações associadas contribuem para o aumento do peso corporal e, consequentemente, desenvolvimento da obesidade.

2.4. Modulação da microbiota no tratamento da obesidade e comorbidades

A microbiota intestinal pode ser modulada de forma benéfica com probiótico, prebiótico ou simbiótico (PANDEY *et al*., 2015). Probióticos são microorganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano produzindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (BRASIL, 2002). As bactérias mais utilizadas são as que pertencem aos gêneros: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas também podem ser usadas *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus*. Elas podem ser dadas ao hospedeiro na forma de cápsulas, sachês, iogurte ou leite fermentado (GUARNER *et al.*, 2011).

A seleção de bactérias probióticas para adição em alimentos deve levar em conta os critérios a seguir: cepas probióticas oriundas de origem humana; ser seguro, sem possibilidade de gerar resistência aos antibióticos; capacidade de sobreviver ao ácido clorídrico do estômago e aos ácidos biliares; capacidade de se manter, reproduzir e colonizar o intestino; capacidade de produzir metabólitos que modulem beneficamente o metabolismo e a imunidade do hospedeiro; ter atividade antimicrobiana e contribuir com o equilíbrio da microbiota intestinal (GIBSON; FULLER, 2000).

Prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microorganismos do hospedeiro, conferindo benefícios (GIBSON *et al*., 2017). Dentre eles podem ser citados

frutanos (frutooligossacrídeos (FOS) e inulina), galactanos (galactooligossacarídeo (GOS)), outros oligossacarídeos (mananoligossacarídeo e xilooligossacarídeo), fibras dietéticas fermentáveis, ácido linoleico conjugado, AGPI, compostos fenólicos e fitoquímicos. Entretanto frutanos e galactanos são os mais estudados, relacionando os efeitos sobre a microbiota intestinal e a saúde humana. Estes também são fermentados por bactérias do gênero *Bifidobateruim*, sendo muitas vezes mencionados como bifidogênicos na literatura (GIBSON *et al*., 2017).

Simbióticos podem ser definidos como a associação de probiótico com prebiótico (KOLIDA; GIBSON, 2011). A elaboração de produtos com função simbiótica deve ser feita de forma criteriosa para garantir a viabilidade e estabilidade do produto. Como exemplo de produto simbiótico pode ser citado o iogurte com prebiótico e probiótico na sua fórmula (KOLIDA; GIBSON, 2011).

A modulação da microbiota intestinal por meio destes compostos pode restabelecer o equilíbrio nas bactérias intestinais revertendo as alterações oriundas da disbiose citadas anteriormente. Assim, com o restabelecimento da barreira intestinal, cessa a translocação de LPS para corrente sanguínea, reduzindo a inflamação, a endotoxemia metabólica e RI, especialmente em fígado, TA, músculos e hipotálamo (CARVALHO; SAAD, 2013; POTHURAJU; SHARMA, 2018). Além disso, o sistema eCB também tem o seu funcionamento normalizado, promovendo a diminuição do efeito negativo sobre a barreira intestinal, e, contribuindo também com a redução da translocação de LPS e inflamação (CARVALHO; SAAD, 2013).

A supressão de fiaf cessa, o que permite que este iniba a atividade da LPL, reduzindo o acúmulo de TG em TA e músculos (CARVALHO; SAAD, 2013). Com isso, a AMPK deixa de estar suprimida, favorecendo a oxidação lipídica em músculos e TA, impedindo a deposição de gordura corporal. Também há a normalização da secreção dos hormônios anorexígenos (GLP-1 e PYY), que passam a exercer sua função na saciedade de forma adequada. Associado a isso, a melhora na sensibilidade à insulina em hipotálamo melhora o controle de saciedade que este órgão exerce (CARVALHO; SAAD, 2013; POTHURAJU; SHARMA, 2018).

Há evidências na literatura que vem apontando o potencial efeito do uso de probiótico e simbiótico no manejo da obesidade e comorbidades (DONG et al., 2013; ESLAMPARAST *et al*., 2014; KHALESI *et al*., 2014; RABIEI; SHAKERHOSSEINI; SAADAT, 2015; ZHANG; WU; FEI, 2015; HE; ZHANG; HAN; 2017; BORGERAAS *et al*., 2018). Entretanto, há controvérsias entre os estudos publicados até o momento,

tendo alguns trabalhos demonstrados nenhum efeito sobre estes parâmetros (MILLION *et al*., 2012b; PEÑA *et al*., 2014; IVEY *et al*., 2014 e 2015; PARK; BAE, 2015; CROVESY *et al*., 2017).

Existem cinco revisões sistemáticas com ou sem metanálise publicadas até o momento que abordam o efeito de probiótico sobre o peso corporal. De forma geral, os resultados são controversos, sendo possível encontrar efeitos positivos ou nenhuma evidencia dos efeitos dos probióticos sobre o peso corporal (MILLION *et al*., 2012b; PARK; BAE, 2015; ZHANG; WU; FEI, 2015; CROVESY *et al*., 2017; BORGERAAS *et al*., 2018).

Em 2012, foi publicada a primeira metanálise sobre o tema por Million *et al*. (2012b). Eles demonstraram que o efeito do probiótico sobre o peso corporal, ganho ou perda, é dependente da cepa usada. Porém, no trabalho foram incluídos estudos com animais e humanos. Corroborando com os resultados de Million *et al*. (2012), uma revisão sistemática publicada pelo nosso grupo de pesquisa verificou que dependendo da cepa de *Lactobacillus* usada por humanos com excesso de peso, pode haver perda ou ganho de peso corporal. Ademais destacamos no trabalho as cepas que promoveram redução no peso e/ou adiposidade (CROVESY *et al*., 2017). Dentre as cepas associadas à perda de peso e/ou adiposidade destacamos: *L. plantarum* associado ao *L. rhamnosus* e dieta hipocalórica; *L. plantarum* com *L. curvatus; L. gasseri; L. amylovorus; L. acidophillus* e *L. casei* associados com compostos fenólicos; ou mix de *Lactobacillus*.

Park e Bae (2015) realizaram uma metanálise para avaliar os efeitos de probiótico sobre o peso corporal em indivíduos com excesso de peso e não encontraram efeitos positivos sobre peso corporal, IMC e gordura corporal. Já Borgeraas *et al*. (2018), mostram que o probiótico é capaz de reduzir estes parâmetros, quando este é utilizado por até 12 semanas, entretanto o efeito foi pequeno. Outra metanálise concluiu que os probióticos são promissores no manejo da obesidade, mostrando redução no peso corporal, quando administrado mais de uma cepa associada em tempo mínimo de 8 semanas. Ademais, os autores verificaram que os efeitos positivos sobre o peso corporal e IMC são mais efetivos em indivíduos com excesso de peso do que em eutróficos (ZHANG; WU; FEI, 2015).

He, Zhang e Han (2017) conduziram uma metanálise que avaliou se probiótico poderia melhorar a glicemia, perfil lipídico e PA em indivíduos com DM2. Eles encontraram que a administração de probiótico leva a redução de colesterol total (CT), LDL-c, TG, pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), e aumento

de HDL-c. Outro trabalho observou que o probiótico tem potencial para melhorar CT e LDL-c, entretanto, parece ser mais efetivo em indivíduos com hipercolesterolemia e quando a intervenção tem duração a partir de 8 semanas. Com relação às cepas com efeitos hipocolesterolêmicos podem ser citadas: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, e associação de *L. acidophilus* e *B. lactis* (CHO; KIM, 2015).

Recentemente, uma revisão sistemática e uma metanálises com revisão sistemática que avaliaram efeito de probiótico sobre a perda de peso corporal em indivíduos com excesso de peso corporal foram publicadas (SUZUMURA *et al*., 2019; GUAZZELLI MARQUES *et al*., 2020). Como resultados foram encontrados redução de massa gorda corporal (MGC) em poucos estudos incluídos (GUAZZELLI MARQUES *et al*., 2020) e redução de PC (SUZUMURA *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a heterogeneidade dos estudos, devido às diferentes cepas utilizadas, tempo de intervenção e associação com outros compostos bioativos, dieta e/ou exercício físico, dificulta a determinação de que cepas podem ser usadas no manejo da obesidade (PARK; BAE; 2015; CROVESY *et al*., 2017). Também é possível verificar que a maioria dos ensaios clínicos de intervenção com probiótico no peso corporal utilizam bactérias do gênero *Lactobacillus*, mostrando escassez de estudos com *Bifidobacterium* (MILLION *et al*., 2012b; PARK; BAE, 2015; ZHANG; WU; FEI, 2015; CROVESY *et al*., 2017. BORGERAAS *et al*., 2018). Guazzelli Marques *et al*. (2020) ainda discutem em seu trabalho a falta de cuidado com a avaliação de alguns parâmetros que podem influenciar no resultado da intervenção, como avaliação das calorias e a composição nutricional da dieta ingeridas pelos voluntários e o pequeno número de participantes dos estudos.

Em contrapartida, Ivey *et al*. (2014 e 2015) avaliaram os efeitos de probiótico (iogurte probiótico + cápsula probiótica; iogurte probiótico + cápsula placebo; leite controle + cápsula probiótica; leite controle + cápsula placebo) contendo $3{,}0 \times 10^9$ unidade formadora de colônia (UFC) de *L. acidophilus* e *B. lactis* em indivíduos com excesso de peso. Os autores verificaram que o probiótico não promoveu alteração na PA, perfil lipídico, glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c) e *Homeostasis Model Assessment Resistance Insulin* (HOMA-IR) após 6 semanas de intervenção (IVEY *et al*., 2014; IVEY *et al*., 2015).

Uma metanálise que visou avaliar se intervenção com probiótico é capaz de melhorar a PA encontrou resultados mais efetivos naqueles indivíduos com alteração na PA no período basal, usando mais de uma cepa probiótica, e em tempo mínimo de 8

semanas e dose superior à 10^{10} UFC (KHALESI *et al*., 2014). Outra metanálise concluiu que leite fermentado probiótico poderia reduzir a PA de indivíduos pré-hipertensos e hipertensos (DONG *et al*., 2013).

Com relação ao simbiótico, há menos estudos na literatura que avaliaram seus efeitos sobre o peso corporal e parâmetros metabólicos associados à obesidade. Moroti *et al*. (2012) avaliaram os efeitos de uma intervenção com um *shake* (200 ml/dia) contendo $4x10^8$ UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* e 2 g de oligofrutose em mulheres com alteração em glicemia (> 110 mg/dL), CT (> 200 mg/dL) e trigliceridemia (> 200 mg/dL) por 30 dias e observou redução de CT, TG, colesterol não HDL e glicemia.

Outro estudo com adultos com síndrome metabólica submetidos a um plano alimentar hipocalórico com restrição calórica de 500-1000 kcal e suplementação ou não com cápsulas contendo $2x10^8$ UFC de *L.casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B.breve*, S*treptococcus thermophilus*, e FOS por 28 semanas observou que o simbiótico melhorou o controle glicêmico, com redução de glicemia, HOMA-IR e melhora no *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (QUICKI). Ambos os grupos apresentaram redução em TG, entretanto a redução foi superior no grupo simbiótico, diferindo estatisticamente do controle. Peso corporal, IMC e ingestão calórica não alteraram (ESLAMPARAST *et al*., 2014).

Pacientes com DM apresentaram redução na insulina e PCR, entretanto não tiveram efeito em peso corporal, IMC, perfil lipídico, glicemia e HOMA-IR após intervenção com composto simbiótico contendo 10^7 UFC de *L. sporogen*es e 0,04 g de inulina (ASEMI *et al*., 2014). Peña *et al*. (2014) também não encontraram melhora em IMC, MGC, PC, PA perfil lipídico, controle glicêmico e marcadores inflamatórios após ingestão de saches contendo 10^{10} UFC de *B. lactis* e 8 g de oligofrutose por 6 semanas. Entretanto, Rabiei, Shakerhosseini e Saadat (2015) encontraram resultados sobre os parâmetros antropométricos (IMC, PC, perímetro de quadril, MGC, massa livre de gordura (MLG)) e PAS em indivíduos com excesso de peso com síndrome metabólica utilizando 2 cápsulas simbióticas contendo $2x10^8$ UFC de *L.casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B.breve*, S*treptococcus thermophilus* e FOS, associado ao plano alimentar hipocalórico.

Duas metanálises com revisão sistemática foram conduzidas com objetivo de avaliar se simbiótico poderia contribuir com a perda de peso em indivíduos com excesso

de peso corporal e encontraram pequeno efeito sobre a perda de peso corporal (HADI *et al*., 2018) e PC (HADI *et al*., 2018; SUZUMURA *et al*., 2019).

Um estudo experimental em ratos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica, que receberam 10^{10} UFC de *B. animalis* BB-12 associado ou não à oligofrutose por um período de 8 semanas resultou em melhora da glicemia de jejum, e redução na insulina e aumento no GLP-2 apenas no grupo probiótico, porém sem alteração no peso corporal (BOMHOF *et al*., 2014).

Stenman *et al*. (2016) avaliaram a influência do uso por 6 meses de cápsulas contendo 10^{10} UFC de *B. animalis* spp. *lactis* 420 associadas ou não a 12 g de polidextrose sobre a MGC, controle glicêmico, lipemia, inflamação e permeabilidade da barreira intestinal (zonulina circulante) em indivíduos com excesso de peso, e encontraram que o probiótico e simbiótico foram capazes de reduzir adiposidade, principalmente central, peso corporal, PC e ingestão alimentar. Possivelmente estes efeitos são atribuídos à redução da permeabilidade da barreira intestinal e melhora da inflamação de baixo grau (STENMAN *et al*., 2016).

Uma metanálise que objetivou avaliar o efeito de probiótico, prebiótico e simbiótico sobre a perda de peso corporal observaram que o uso destas intervenções foi capaz de reduzir o peso corporal e IMC, num período superior a 12 semanas, e gordura corporal, em período menor que 12 semanas. Entretanto quando os autores conduziram análise estatística estratificando por cada modulador (prebiótico, probiótico e simbiótico), o simbiótico não se mostrou eficiente para promover redução no peso corporal e IMC, devido aos poucos estudos encontrados na literatura. Já o probiótico mostrou ser efetivo na perda de peso corporal e redução de IMC (JOHN *et al*., 2018). Os resultados da intervenção com probiótico e simbiótico discutidos acima estão resumidos na tabela abaixo (**Tabela 1**).

Tabela 1. Resumo dos estudos apresentados dos efeitos de probiótico e simbiótico sobre variáveis antropométricas, metabólicas e ingestão calórica

Autor, ano	População (n)	Desenho de estudo	Intervenção	Desfechos
		Probióticos		
Million *et al*., 2012b	Humanos e modelo experimental *in vivo*	Metanálise	*Lactobacillus*	Ganho ou perda de peso corporal cepa dependente

Dong *et al*., 2013	Humanos adultos	Metanálise	Leite fermentado probiótico	↓ PA em pré- e hipertensos
Khalesi *et al*., 2014	Humanos adultos com ou sem hipertensão	Metanálise com revisão sistemática	Probiótico	↓ PA alterada, usando mais de 1 cepa probiótica, por no mínimo 8 semanas e em dose < 10^{10}UFC
Ivey *et al*., 2014 e 2015	Adultos com excesso de peso corporal (n=156)	ECR, duplo-cego, paralelo, controlado	GT1: Iogurte e cápsula contendo cada um GT2: Iogurte contendo $3{,}0x10^9$ UCF de *L. acidophilus* e *B. lactis* e cápsula placebo GT3: Leite placebo e cápsula contendo $3{,}0x10^9$ UCF de *L. acidophilus* e *B. lactis* GC: leite e cápsula placebos Duração: 6 semanas	Sem alteração nos parâmetros analisados (perfil lipídico, controle glicêmico e PA)
Cho; Kim, 2015	Humanos	Metanálise	Probiótico	↓ CT e LDL-c, sendo mais efetivo em hipercolesterolêmicos e no mínimo 8 semanas
Park; Bae, 2015	Indivíduos com excesso de peso	Metanálise com revisão sistemática	Probiótico	Sem efeito sobre peso corporal, IMC e MGC
Zhang; Wu; Fei, 2016	Adultos eutróficos e com excesso de peso	Metanálise com revisão sistemática	Probiótico	↓ peso corporal com mais de 1 cepa probiótica e no mínimo 8 semanas ↓ peso corporal e IMC mais efetivo no excesso de peso
Crovesy *et al*., 2017	Indivíduos com excesso de peso	Revisão sistemática	*Lactobacillus*	O efeito sobre o peso é cepa dependente
He, Zhang, Han, 2017	Indivíduos com DM2	Metanálise	Probiotico	↓ CT, LDL-c, TG, PAS, PAD ↑ HDL-c
Borgeraas *et al.*, 2018	Indivíduos com excesso de peso	Metanálise e revisão sistemática	Probiótico	↓ peso corproal, IMC e MGC com menos de 12 semanas
Guazzelli Marques *et al*., 2020	Indivíduos com excesso de peso	Revisão sistemática	Probiótico	↓ MGC
Suzumura *et al*., 2019	Indivíduos com excesso de peso	Metanálise e revisão sistemática	Probiótico	↓ PC
Simbióticos				

Moroti *et al*., 2012	Mulheres adultas com DM2 e dislipidemia (n = 18)	ECR, duplo-cego, paralelo, controlado	GT: shake contendo 4 x10^8 UFC/mL de *L. acidophilus* e *B. bifidum* e 1g FOS/100mL GC: shake controle 200 mL de shake/dia Duração: 30 dias	↓ CT, TG, colesterol não HDL, glicemia de jejum
Eslamparast *et al*., 2014	Adultos com síndrome metabólica (n=38)	ECR, duplo-cego, paralelo, controlado	GT: cápsulas contendo 2x10^8 UFC de *L. casei, L. rhamnosus, L. bulgaricus, L. acidophilus, B. breve, B. longum* e *S. thermophilus* e 250mg de FOS GC: cápsula placebo Atividade física (4-5 vezes/semana) e dieta hipocalórica com restrição de 500-1000 kcal Duração: 28 semanas	↓ CT nos dois ↑ HDL-c nos dois grupos ↓ TG, glicemia de jejum e HOMA-IR e QUICKI ↔ IMC, PC, ingestão calórica
Asemi *et al*., 2014	Adultos com DM2 (n=62)	ECR, duplo-cego, *crossover*, controlado	GT: composto simbiótico contendo 1x 10^7 UFC de *L. sporogenes* GC: apenas excipiente 3 pacotes do composto (9g/dia) Duração: 6 semanas *Washout*: 3 semanas	↓ insulina de jejum e PCR ↔ peso corporal, IMC glicemia de jejum, HOMA-IR, perfil lipídico
Peña *et al*., 2014	Adultos com obesidade (n=40)	ECR, duplo-cego, paralelo, controlado	GT: sachê contendo 10^{10} UFC *B. lactis* e 8g de oligofrutose GC: sachê contedo maltodextrina Duração: 6 semanas	↔ IMC, MGC, PC, PA perfil lipídico, controle glicêmico e marcadores inflamatórios
Rabiei; Shakerhosseini; Saadat, 2015	Adultos com síndrome metabólica (n=46)	ECR, triplo-cego, paralelo, controlado	GT: 2 cápsulas/dia contendo 2x10^8UFC de *L. casei, L. rhamnosus, L. acidophilus, L. bulgaricus, B. bereve, B. longum*e *Streptococcus thermophilus*e FOS Duração: 12 semanas	↓IMC, PC, perímetro de quadril, MGC e PAS

Hadi *et al*., 2018	Adultos com excesso de peso corporal	Metanálise e revisão sistemática	Simbiótico	↓ peso corporal e PC
Suzumura *et al*., 2019	Indivíduos com excesso de peso	Metanálise e revisão sistemática	Simbiótico	↓ PC
Probiótico e simbiótico				
Bomhof *et al*., 2014	Ratos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica (n=40)	Estudo experimental paralelo, controlado	GT1: 10^{10} UFC *B. animalis* GT2: oligofrutose GT3: 10^{10} UFC *B. animalis* BB-12 e oligofrutose Duração: 8 semanas	↓ glicemia (todos os grupos testes) e insulina (GT1 e GT2) e GLP-2 (GT1) ↔ peso corporal
Stenman *et al*., 2016	Adultos com excesso de peso (n=134)	ECR, duplo-cego, paralelo, controlado	GT1: Sachê contendo 10^{10} UFC de *B. lactis* 420 GT2: Sachê com 12g de polidextrose GT3: Sachê contendo 10^{10} UFC de *B. lactis* 420 e 12g de polidextrose GC: Celulose Duração: 6 meses	↓ peso corproal, MGC, PC, ingestão energética
John *et al*., 2018	Adultos com excesso de peso (probiótico n= 22; prebiótico n=6; simbiótico n=5)	Metanálise	Probiótico, prebiótico e/ou simbiótico	↓ peso corporal, IMC (> 12 semanas de intervenção) e MGC (< 12 semanas de intervenção) ao avaliar todas as intervenções juntas ↔ peso corporal e IMC no simbiótico isolado ↓ peso corporal, IMC no probiótico isolado
Suzumura *et al*., 2019	Indivíduos com excesso de peso	Metanálise e revisão sistemática	Probiótico e simbiótico	↓ PC

B.: *Bifidobacterium*; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; ECR: ensaio clínico randomizado; CT: colesterol total; FOS: frutooligossacarídeo; g: grama; GT: grupo teste; GC: grupo controle; HDL-c: *high density lipoprotein cholesterol*; HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment Resistanc eInsulin*; IMC: índice de massa corporal; kcal: quilocalorias; *L*.: *Lactobacillus*; LDL-c: *low density lipoprotein cholesterol*; MGC: massa gorda corporal; mL: mililitro; PA: pressão arterial; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial

sistólica; PC: perímetro de cintura; QUICKI: *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*; *S.*: *Streptococcus*; TG: triglicerídeos; UFC: unidade formadora de colônia

2.5. Metabolômica na obesidade

A metabolômica é a técnica que identifica e quantifica os metabólitos, que são moléculas de baixo e médio peso molecular (< 1500 Dalton) e podem ser substratos, intermediários metabólicos ou produto final de reações bioquímicas mediadas por enzimas de um organismo ou amostra biológica. Essa técnica vem sendo apontada como a mais promissora dentre as técnicas ômicas (genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica), por possibilitar visualizar o produto final produzido pelas células e tecidos do corpo (GOODACRE *et al*., 2004). Ela é utilizada para investigar complexas interações entre metabólitos e seu papel regulador desempenhado na interação entre genes, transcritos e proteínas (DUNN *et al*., 2011; BRENNAN, 2014).

A análise pode ser realizada por meio de diferentes ferramentas: a espectroscopia por ressonância magnética nuclear ou a espectrometria de massas, que pode ser associada às cromatografias líquidas ou gasosas (GOODACRE *et al*., 2004; VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007). Além disso, existem dois tipos de abordagens que podem ser feitas: metabolômica alvo e global. Na metabolômica alvo, inicialmente define qual(is) o(s) metabólito(s) de interesse a serem analisados na amostra (AGIN *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018), enquanto a global avalia todos os metabólitos produzidos pela amostra sem o conhecimento prévio de quais metabólitos serão encontrados, e, ao final, identifica os metabólitos por comparação com banco de dados de metaboloma (CANUTO *et al.*, 2018).

Por intermédio desta análise é possível verificar o funcionamento do organismo. O corpo humano é extenso e a integridade do mesmo não é um reflexo apenas do genótipo, mas, também, depende de fatores externos como ambiente e comportamento, além da interação com o genoma de outros organismos simbióticos, como as bactérias da microbiota intestinal do indivíduo (TIRET, 2002; NICHOLSON *et al.*, 2004; CALVANI et al., 2014). Ademais, pode-se verificar pelo estudo do perfil metabólico modulações metabólicas ocorridas por alterações no padrão alimentar ou introdução de algum alimento/nutriente diferente na alimentação. Neste sentido, a metabolômica pode ser uma análise importante para avaliar as preferências alimentares do indivíduo e se determinada intervenção pode trazer benefícios ao metabolismo (REZZI *et al*., 2007; BRENNAN, 2014).

Além da alimentação, a microbiota intestinal é capaz de influenciar o perfil metabólico dos órgãos, sangue e urina do hospedeiro, pois os metabólitos que são produzidos pelas bactérias, absorvidos pelas células do intestino e transportadas para a circulação do indivíduo são cruciais para a saúde ou desenvolvimento de doenças no hospedeiro (MATSUMOTO *et al*., 2012).

O estudo do perfil metabolômico pode melhorar a compreensão das alterações metabólicas que ocorrem em indivíduos com obesidade, além de abranger a visão dos mecanismos da doença (TSUTSUI *et al*., 2011). Um experimento em camundongos avaliou cerca de 167 metabólitos, dos quais 12 foram associados a obesidade (KIM *et al*., 2011). Uma revisão na literatura que correlacionou o IMC com perfil de aminoácidos verificou que estes estão associados, em especial os AACR, à obesidade (MORRIS *et al*., 2012).

He *et al*. (2012) observaram aumento em HDL-c, VLDL-c, lipídios, AGI, glicoproteína, mioinositol, piruvato, treonina, tirosina e creatina em porcos obesos quando comparados à porcos magros. Ademais, também foram verificadas alterações metabólicas relacionadas à microbiota intestinal dos animais obesos. Estes resultados mostram que os porcos obesos têm metabolismo diferente dos magros, com alteração na lipogênese, oxidação de lipídios, utilização e participação da energia e na fermentação das bactérias que habitam o TGI (HE *et al*., 2012).

A presença da obesidade parece perturbar o metabolismo do indivíduo causando alterações no metabolôma do mesmo (CIRULLI *et al.*, 2019). O catabolismo de aminoácidos no indivíduo com obesidade está associado à RI, favorecendo o acúmulo de aminoácidos no sangue, especialmente os AACR (ADAMS, 2011; BAGHERI *et al.*, 2019), por conta da redução na expressão de aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada mitocondrial (BCATm) e α-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD) no TA (SHE *et al*., 2007; LACKEY *et al.*, 2013). Além disso, os AGL estão em excesso nos obesos e para serem usados como fonte de energia precisam ser oxidados na beta-oxidação nas mitocôndrias. É necessário que o AGL seja carreado pela carnitina para as mitocôndrias, porém na obesidade não há carnitina suficiente para transportar os AGL excedentes, ficando estes disponíveis (CHA, 2008).

Estudo em humanos verificou correlação de 48 metabólitos com o IMC. Destes, tiveram correlação positiva com o indicador de avaliação de obesidade o glutamato, AACR e metabólitos relacionados à AACR, já serina, citrato e asparagina foram negativamente associados. Ademais, parece que o aumento nos metabólitos associados à

obesidade é dependente da microbiota intestinal. Os gêneros *Bautia*, *Dorea* e *Ruminococcus* estão associados aos metabólitos ligados ao IMC (OTTOSSON *et al*., 2018).

Parece haver um link entre a composição da microbiota intestinal e alterações no metabolismo do hospedeiro que levariam à obesidade (LIU *et al*., 2017). Estes autores observaram alterações na composição da microbiota entre indivíduos eutróficos e com obesidade, além da identificação de 148 metabólitos que divergiram segundo o estado nutricional. Ademais, os autores encontraram associação entre o aumento de aminoácidos aromáticos e AACR e redução em *Bacteroidetes.* Estes aminoácidos têm correlação positiva com HOMA-IR, glicemia, lipemia e marcadores inflamatórios. Parece que algumas bactérias pertencentes a este filo, principalmente *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bacteroides ovatus* fermentam AACR, o que poderia justificar a correlação inversa entre eles (LIU *et al*., 2017).

Os indivíduos com obesidade tiveram maiores níveis de glutamato, que é correlacionado positivamente com IMC, razão cintura quadril, PC, HOMA-IR, PCR e TG. *Ruminococcus* sp., *Dorealongicatena*, *Corprococcus comes* e OB-8293 apresentaram correlação positiva com glutamato e negativa com glutamina, pois estas bactérias codificam enzimas que convertem glutamina em glutamato. Também foi observada correlação negativa de *Bacteroides thetaiotaomicron* com glutamato. Estas bactérias convertem glutamato em ácido gama-aminobutírico (GABA), por meio da codificação da glutamato descarboxilase, sendo a depleção desta uma explicação para o aumento deste metabólito no indivíduo com obesidade (LIU *et al*., 2017).

Em estudo experimental com camundongos foi possível observar o papel que *Bacteroidetes thetaiotaomicron* tem na adiposidade. A administração por gavagem desta bactéria nos camundongos levou a redução de MGC e inguial, aumento de MLG nos ratos em dieta normal. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e recebendo a bactéria, as concentrações de adiponectina aumentaram e de leptina reduziram, o TA apresentou adipócitos menores e menor expressão de marcadores inflamatórios, além disso, houve redução na expressão de genes envolvidos na lipogênese e, em contrapartida, aumento nos genes envolvidos na lipólise e oxidação lipídica (LIU *et al*., 2017).

3. Justificativa

A obesidade é um importante problema de saúde pública que tem recebido atenção mundial devido a sua complexidade, o que a torna de difícil controle, além da falta de tratamentos efetivos para a doença. No contexto de sua etiologia, recentemente vem sendo explorado o envolvimento da microbiota intestinal na sua gênese e sua relação com o funcionamento adequado do metabolismo de seu hospedeiro, gerando um novo caminho a ser explorado como um possível coadjuvante no tratamento da doença.

Neste sentido, a modulação benéfica da microbiota intestinal por meio de probiótico ou simbiótico deve ser estudada a fim de desvendar os efeitos que a modulação pode promover sobre o peso corporal, parâmetros associados às comorbidades e metabolismo de mulheres com obesidade. Ademais, a aplicação da abordagem metabolômica pode auxiliar na compressão dos mecanismos pelos quais a modulação da microbiota intestinal do indivíduo com obesidade pode resultar em alterações no metabolismo energético, lipídico e glicídico, o que poderia beneficiar no controle da doença.

Não há estudos em humanos de modulação intestinal na obesidade que tenham avaliado os possíveis mecanismos por meio da abordagem de metabolômica, relacionando a modulação da microbiota intestinal com as melhoras no metabolismo do hospedeiro, e, consequentemente, sobre o peso corporal e parâmetros associados à comorbidades da doença.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar a influência de probiótico *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) e simbiótico (*B. lactis* e FOS) associados a um plano alimentar hipocalórico por 60 dias, sobre a composição da microbiota intestinal, perfil metabolômico, peso corporal, composição corporal, glicemia, lipemia e pressão arterial em mulheres com obesidade grau I e II.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar se probiótico e simbiótico são capazes de modular microbiota intestinal.
- Associar possíveis alterações na composição da microbiota intestinal com variáveis antropométricas (peso, IMC, perímetro de cintura e composição corporal), bioquímicas (glicemia e lipemia) e clínicas (pressão arterial, consistência das fezes e sintomas gastrointestinais).
- Verificar se a modulação da microbiota intestinal por probiótico ou simbiótico influenciam o perfil metabólico do soro.
- Avaliar se as possíveis alterações no perfil metabólico após a intervenção estão associadas às alterações nos demais indicadores analisados.
- Avaliar se a possível modulação da microbiota intestinal se mantém após 15 dias da suspensão do uso de probiótico e simbiótico.
- Verificar se o probiótico e simbiótico podem causar efeitos colaterais e alteração na consistência das fezes.

5. Métodos

5.1. Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada em agosto de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob o protocolo 101-14 (Anexo I).

Todas as mulheres que participaram do estudo foram informadas sobre a natureza do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I), elaborado de acordo com a Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, autorizando a participação na pesquisa.

O estudo foi registrado no *ClinicalTrial* sob o número NCT02505854 (Anexo II).

5.2. Casuística

Trinta e duas mulheres adultas (25-50 anos), com obesidade graus I ou II (IMC entre 30-39,99 kg/m²) foram selecionadas para participar do estudo por meio de divulgação da pesquisa na página do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da UFRJ. Foram consideradas não elegíveis gestantes; lactantes; tabagistas; elitistas; que apresentassem diagnóstico de qualquer doença crônica, com exceção da obesidade; em uso de medicamento contínuo, exceto anticoncepcional; em uso de antidepressivos, laxantes, antiácidos, enzimas digestivas, bloqueadores H2, inibidores de bomba de prótons, fitoterápicos, suplementos alimentares, probiótico, prebiótico ou simbiótico; alteração de peso corporal nos últimos três meses; ter sido submetida à cirurgia bariátrica.

5.3. Desenho do estudo

Foi realizado um ensaio clínico paralelo, duplo cego, randomizado e controlado (**Figura 5**).

No primeiro momento, os interessados em participar da pesquisa preencheram um formulário *online* com dados pessoais e referentes aos critérios de elegibilidade. As mulheres consideradas elegíveis foram contactadas e chamadas para participarem da reunião geral. Nesta reunião, a pesquisa foi explicada com detalhes, as dúvidas esclarecidas, o TCLE assinado por aquelas que manifestaram interesse em participar da pesquisa, e a primeira consulta foi agendada. Também foram dadas orientações referentes à coleta e armazenamento das fezes e ao preenchimento do registro alimentar de três dias, para manterem as atividades físicas e evitarem consumo de iogurte, bebida láctea e leite fermentado uma semana antes e ao longo do estudo. A randomização entre os três grupos

(grupo probiótico (GP), grupo simbiótico (GS) e grupo placebo (GC)) foi realizada por meio de sorteio.

No dia da primeira consulta, as voluntárias se apresentaram em jejum de 12 horas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) para coleta de sangue. Após a coleta, elas foram encaminhadas para o Laboratório de Avaliação Nutricional (LANUTRI), onde foram realizadas as avaliações antropométricas, composição corporal e aferição da PA. Em seguida, as mulheres receberam lanche e preencheram alguns questionários (de dados gerais (Apêndice II), questionário Internacional de Atividades Físicas (IPAQ) de forma curta (Anexo III), escala de Bristol (Anexo IV), escala Likert (Anexo V), Questionário de frequência alimentar (QFA) (Apêndice III)), além de terem os registros alimentares de três dias checados e entregarem a amostra de fezes, que foi devidamente identificada e armazenada. Por fim, a intervenção foi entregue junto de um plano alimentar.

A cada semana as pesquisadoras entravam em contato com as voluntárias a fim de avaliar o seguimento da intervenção, presença de intercorrências e esclarecer dúvidas. E quinzenalmente eram marcadas consultas para avaliar a adesão ao tratamento e entregar mais suplementos. Após 60 dias de intervenção todas as análises realizadas na primeira consulta foram repetidas. Além disso, após 15 dias após o término da intervenção as voluntárias retornaram para avaliação antropométrica e entrega de outra amostra de fezes, pois a microbiota intestinal tende a voltar ao seu estado inicial ao suspender o probiótico ou simbiótico em um período de semana.

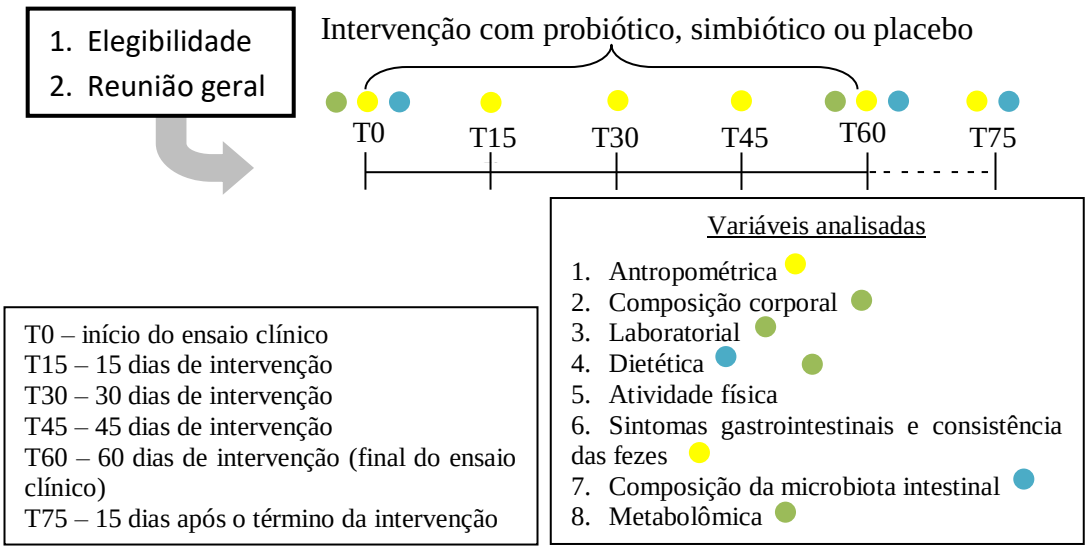


Figura 5. Esquema geral do estudo.

5.3.1. Intervenção

A intervenção foi composta por cápsulas e sachês, de acordo com o grupo, ao qual a voluntária foi randomizada, e plano alimentar hipocalórico. Desta forma: GP recebeu cápsulas contendo 10^9 UFC de *B. lactis* e sachês contendo 5 gramas (g) de maltodextrina, GS recebeu cápsulas com 10^9 UFC de *B. lactis* e sachês com 5 g de FOS, e GC recebeu cápsulas com gelatina e sachês com 5 g de maltodextrina. O anexo VI apresenta especificações referentes ao FOS utilizado na pesquisa.

A restrição calórica do plano alimentar foi efetuada pela equação da European Society for Pareteraland Enteral Nutrition (ESPEN), sendo utilizada a média da faixa recomendada para perda de peso de 23 kcal/kg de peso atual/dia (20-25 kcal/kg de peso atual/dia) (KREYMANN *et al*., 2006). A dieta foi normoglicídica, normoproteica, normolipídica e adequada em fibras, colesterol (COUTINHO, 1999) e ácidos graxos (SANTOS *et al*., 2013), e elaborada utilizando o software DietPro 5i Profissional®. Na Tabela 2 encontra-se a distribuição de macronutrientes, AGS, AGMI, AGPI, colesterol e fibras prescritas para cada valor energético total (VET), no intervalo de 1700 a 2900 kcal.

Tabela 2. Macronutrientes, ácidos graxos, colesterol e fibra da dieta prescrita

Energia (kcal)	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Lipídios (%)	AGS (%)	AGMI (%)	AGPI (%)	Colesterol (mg)	Fibras (g)
1700	19,79	55,14	25,19	4,53	8,73	6,17	154,46	29,16
1800	19,05	55,27	25,69	4,36	9,48	6,19	154,46	29,96
1900	18,48	55,50	25,98	4,54	9,43	6,36	154,46	30,53
2000	17,88	55,60	26,39	4,38	10,07	6,37	154,46	31,33
2100	17,42	55,79	26,62	4,54	10,01	6,52	154,46	31,91
2200	18,01	55,37	26,30	4,50	9,73	6,32	171,8	32,31
2300	17,91	54,95	26,75	5,19	9,31	6,60	184,2	33,11
2400	17,74	55,54	26,34	5,26	9,11	6,51	187,95	33,91
2500	17,36	55,70	26,53	5,35	9,1	6,62	187,95	34,49
2600	17,12	54,83	27,72	5,4	9,94	6,53	191,7	34,49
2700	16,79	55,01	27,85	5,49	9,89	6,63	191,7	35,06
2800	16,44	55,15	28,06	5,27	9,50	6,37	197,9	35,06
2900	16,37	54,76	28,54	5,47	9,24	6,37	197,9	35,06

AGS: ácidos graxos saturado; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados

5.3.2. Avaliação do consumo alimentar

Antes e durante o estudo as mulheres preencheram registros alimentares de três dias não consecutivos, sendo dois referentes a dias típicos (durante a semana) e um dia atípico (final de semana ou feriado) para avaliação da ingestão alimentar (Anexo VI) (DEFINA et al., 2011). As voluntárias receberam junto com registro orientações para o preenchimento do mesmo (Apêndice IV).

Os registros alimentares entregues pelas voluntárias eram revisados pelas pesquisadoras, por meio de um *checklist* (Apêndice V), a fim de verificar se todas as informações necessárias para análise da ingestão alimentar constavam, como o tipo de gordura utilizada para o preparo dos alimentos (banha, azeite, óleo de soja, etc), técnica empregada na forma de preparo (frito, grelhado, cozido, assado, empanado, etc), quantidade em medidas caseiras (colher de sopa, escumadeira, concha, pegador, xícara de chá ou café, copo, etc) e se estavam detalhadas (cheia, rasa ou nivelada, meio, ¼, etc.), itens de adição (açúcar, adoçantes, sal, etc), características dos produtos industrializados (*light*, *diet*, zero, integral, semi-desnatado, desnatado, etc), descrição de receitas incomuns. Ademais, quando o registro apresentava longos intervalos entre refeições e/ou poucos alimentos registrados (menos de cinco) a voluntária era questionada para elucidar se houve esquecimento de registrar alguma refeição (YOKOO *et al*., 2008).

A análise da composição química (energia, macronutrientes, fibra, colesterol, AGS, AGMI e AGPI) dos registros foi realizada pelo programa DietPro 5i Profissional®, utilizando como referências, em ordem de preferência, as seguintes tabelas: Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO) (NEPA, 2011), Philippi (2002), *United States Department of Agriculture* (USDA, 2007).

Para preparações elaboradas que não constavam nas tabelas selecionadas, as voluntárias foram orientadas a descreverem a receita da mesma no registro para que pudéssemos computá-las no programa. Para os alimentos que não constavam no programa consideramos outro com composição semelhante (Apêndice X).

Na tabela TACO, o arroz, feijão e pratos protéicos grelhados não incluem o óleo de soja no preparo. Desta forma, incluímos o óleo de soja no cálculo do registro realizando os seguintes cálculos: para o arroz considerou 4% de óleo de soja sobre o peso do alimento cru; para o feijão, 3,33% de óleo de soja sobre o peso do alimento cru; e para os grelhados, 2,5% de óleo de soja sobre o peso do prato protéico cru e limpo (CAMARGO; BOTELHO, 2005). O peso cru dos alimentos foi calculado por meio da equação: peso

cru = $\frac{\text{peso do alimento cozido ou grelhado}}{\text{fator térmico do alimentos}}$. Os fatores térmicos utilizados foram os propostos por Ornellas (2007).

5.3.3. Avaliação da atividade física

A atividade física foi avaliada por meio do IPAQ forma curta (Anexo II) (MATSUDO *et al*., 2001) antes e no final da pesquisa para verificar se as mulheres seguiram a orientação de mantê-la. Os níveis de atividade foram classificados como: muito ativo quando realizada atividade vigorosa ≥ 5 dias na semana e ≥ 30 minutos por sessão ou atividade vigorosa ≥ 3 dias na semana e ≥ 20 minutos por sessão e atividade moderada e/ou caminhada ≥ 5 dias na semana e ≥ 30 minutos por sessão; ativo: quando realizada atividade vigorosa ≥ 3 dias na semana e ≥ 20 minutos por sessão ou atividade moderada ou caminhada ≥ 5 dias na semana e ≥ 30 minutos por sessão ou qualquer atividade somada (atividade vigorosa + atividade moderada + caminhada) ≥ 5 dias na semana e ≥ 150 minutos na semana; irregularmente ativo A quando realizada atividades (vigorosa + moderada + caminhada) com frequência de 5 dias ou duração de 150 minutos na semana; irregularmente ativo B quando não atinge a recomendação de frequência ou duração referida para irregularmente ativo A; e sedentário quando não realizou atividade física por 10 minutos contínuos na semana (LIMA, 2011).

5.3.4. Avaliação de efeitos colaterais da suplementação

Os efeitos colaterais foram avaliados por meio de dois questionários: a escala de Bristol (Anexo IV), que avalia a consistência das fezes, e a escala Likert (Anexo V), que avalia sinais e sintomas gastrointestinais. A escala de Bristol apresenta sete diferentes ilustrações de consistências de fezes, na qual a voluntária deve marcar aquela que mais se assemelhou com a consistência predominante naquela semana. Os resultados foram mostrados como freqüência, de acordo com a classificação da forma das fezes em: ressecado (1 e 2), normal (3 e 4) e mole (5, 6 e 7) (HEATON *et al*., 1992).

A escala Likert de cinco pontos apresentava alguns sinais e sintomas gastrointestinais, tais como: dor abdominal, distensão abdominal, desconforto abdominal, flatulência, ruídos estomacais ou intestinais, os quais as voluntárias deveriam informar sobre a presença e ausência destes, além da freqüência de ocorrência naquela semana. A frequência variava de 0 pontos - nunca = ausência de sinais e sintomas gastrointestinais, 1 ponto - até duas vezes na semana, 2 pontos - de 3 a 4 vezes na semana, 3 pontos - de 5

a 6 vezes na semana e 4 pontos – todos os dias da semana. Os resultados foram somados gerando um score que poderia variar de 0 a 20, no qual 0 é ausência de sintomas e 20 é a presença de todos os sintomas durante os 7 dias da semana (GUYNNET *et al*., 2009).

5.3.5. Variáveis antropométricas e pressão arterial

Os desfechos antropométricos avaliados foram peso, IMC e PC. Para medição destes seguiu-se protocolo específico (Apêndice VI) (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988).

Para medida do peso foi utilizada uma balança eletrônica da marca Filizola®*Personal* Line 200, com capacidade de 200 kg e precisão de 50 g. As voluntárias foram orientadas a comparecerem a todas as consultas com a roupa semelhante, a fim de evitar interferência desta na medida. Além disso, elas deveriam estar descalças e não poderiam portar quaisquer objetos nos bolsos (Apêndice VI) (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988; WHO, 1987).

O IMC foi calculado por meio da fórmula $\mathrm{IMC} = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{altura (m)}^2}$. Para isso foi necessário medir a estatura das mulheres, a qual foi obtida utilizando antropômetro portátil da marca Alturaexata®, com precisão de 1mm. As voluntárias realizaram esta medida descalças, com pés juntos, braços relaxados ao lado do corpo e o olhar no plano de Frankfurt (Apêndice VI) (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988; WHO, 2004).

O PC foi medido no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela, utilizando fita antropométrica em material inelástico e inextensivo da marca Sanny® modelo TR4011 (Apêndice VI). Esta medida foi realizada duas vezes não consecutivas (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988; WHO, 2000).

A composição corporal foi realizada com o aparelho de bioimpedância elétrica (BIA) multifrequencia tetrapolar horizontal da marca *Biodynamics*® modelo 450. Este método é baseado no princípio de que a MLG facilita a condução elétrica, comparada a MGC (LUKASKI *et al*., 1985). As voluntárias realizaram o exame em jejum, sem poder ingerir líquidos uma hora antes da análise, ademais elas foram orientadas a urinar antes do procedimento (LUKASKI *et al*., 1985) (Apêndice VII).

Para estimar a MLG, os dados obtidos na BIA foram empregados na equação preditiva proposta por Segal *et al*. (1988) e validada por Gray *et al*. (1989) para mulheres obesas.

$$MLG = [(0{,}00091186 \times altura\ (cm)^2 - (0{,}01466 \times resistência) + (0{,}29990 \times peso\ corporal\ (kg)) - (0{,}07012 \times idade\ (anos)) + 9{,}37938]$$

A PA foi aferida com as mulheres sentadas após repouso de 5 minutos com o aparelho automático da marca Omron® modelo HEM 742 INT, seguindo protocolo (Anexo VIII) de acordo com o que foi preconizado pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (MALACHIAS *et al.*, 2016). O manguito utilizado no momento da aferição era específico para indivíduos obesos.

5.3.6. Variáveis laboratoriais

As coletas e análises de sangue, com exceção da análise de metabolômica, foram realizadas no LACFAR da UFRJ após jejum noturno de 12 horas. A coleta de sangue foi realizada por pessoal treinado, utilizando material descartável, por punção venosa em tubos Vacutainer® (BD Becton, Dickinson and Company, EUA) contendo anticoagulante EDTA K2 para dosagem de insulina; com ativador de coágulo e gel separador para lipemia e obtenção de soro para metabolômica; e contendo fluoreto de sódio e anticoagulante EDTA sódico para dosagem de glicose.

As análises de glicemia (LOTT e TURNER, 1975), CT (RICHMOND, 1973), HDL-c (KOSTNER *et al*., 1979) e TG (MCGOWAN *et al*., 1983) foram conduzidas pelo método enzimático-colorimétrico utilizando os kits comerciais Glicose PAP Liquiform, Colesterol Liquiform, HDL LE e Triglicérides Liquiform, todos da Labtest Diagnóstica®, respectivamente. LDL-c e VLDL-c foram calculados utilizando a fórmula de Friedwald, Levy e Fredrickson (1972). A insulina foi analisada por quimioluminescência utilizando o *kit* Beckham®.

O HOMA-IR foi calculado baseado na glicemia e insulina de jejum para avaliar a RI (MATTHEWS *et al*., 1985). A fórmula utilizada para calcular o HOMA-IR foi: $\mathrm{HOMA-IR} = \frac{\text{glicemia de jejum (mg/dL) x insulina de jejum (µU/L)}}{405}$, e a classificação foi baseada nos pontos de cortes proposto por Stern *et al*. (2005), considerando com RI quando: HOMA-RI > 4,65 ou IMC > 28,9kg/m^2 ou HOMA-IR >3,60 e IMC > 27,5kg/m^2.

5.3.7. Análise da microbiota por meio das fezes

A análise da composição da microbiota intestinal foi realizada para verificar se o uso de probiótico e simbiótico foi capaz de modulá-la. Foram avaliados os principais filos que compõem a microbiota intestinal *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria,*

Proteobacteria e *Verrucomicribia* por meio de amostra de fezes, na qual se obtém o ácido desoxirribonucléico (DNA) das bactérias presentes na amostra, e a quantificação foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) no Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goes (IMPG).

5.3.7.1. Extração e avaliação da qualidade do DNA

Em uma amostra de aproximadamente 200 mg de fezes foi extraído o DNA utilizando o *kit* comercial QIAamp® fast DNA stool mini da Biotech (Qiagen, Düsseldorf, Germany), seguindo as instruções do fabricante.

Para tal, a amostra de fezes recebeu diferentes soluções e passou por processos de centrifugação, que possuem importante papel na separação do DNA. A primeira solução adicionada ao material homogenizou e promoveu a lise celular. A temperatura de 95ºC contribui para o processo de lise celular das bactérias da amostra, e o processo mecânico obtido pela centrifugação do tubo leva a colisão entre as células, o que promove a ruptura de suas membranas.

A segunda etapa consistiu na purificação do DNA para que este pudesse ser analisado por meio da RT-PCR. As soluções adicionadas à amostra digerem as proteínas e retém as impurezas presentes na mesma. O DNA aderindo à membrana sílica passou por lavagem e centrifugação por duas vezes a fim de eliminar quaisquer impurezas que pudessem estar ligadas ao DNA. Deste modo restou apenas o DNA puro que foi utilizado para quantificar as bactérias presentes na microbiota intestinal por RT-PCR.

A integridade do DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Para execução desta etapa do experimento foram adicionados 1 μL de tampão à 5 μL do DNA extraído da amostra. O volume total foi inserido nos poços do gel, que foi submerso em tampão TAE 1X e submetido à eletroforese a 100 V. O resultado foi obtido após coloração do gel com *SYBR Safe* por 30 min e visualizado sob luz ultravioleta.

5.3.7.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

O método de RT-PCR foi utilizado para quantificação relativa dos principais filos que compõem a microbiota *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*e *Verrucobacteria*, e a classe ɣ-*Proteobacteria*, a fim de avaliar se a intervenção alterou a composição desta. Esta avaliação foi realizada por meio da detecção de genes de rRNA 16S.

A mistura da reação para RT-PCR foi efetuada em placa de 96 poços MicroAmpOptical 96-Well (Life Technologies), na qual foram colocados 4µl de molde de DNA diluído quatro vezes, 6µl da solução SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,2µl de cada iniciador (*primers*) (**Tabela 3**) em cada poço e 1,6µl de água, totalizando um volume de 12µl em cada poço. Em todas as corridas foram feitos controles negativos (NTC – *Non-Template Control*), no qual não houve a inclusão do DNA, para verificar contaminação na reação. Após o preenchimento da placa com as misturas, esta foi vedada com filme ótico adesivo MicroAmp® 96-Well Optical Adhesive Film (Life Technologies).

As reações foram realizadas no equipamento StepOne Plus™ Real Time PCR System (Life Technologies), programado da seguinte forma: 45 ciclos de 50ºC /2 min, 95°C/10 min, 95°C/30s, e 60°C/1 min. Os resultados foram obtidos por meio do *Software* StepOne™ v2.3 (Life Technologies) e a quantificação relativa à abundância dos diferentes filos e classe foi normalizada por ΔCt da quantificação total de bactérias presente na amostra. Para detecção de formação de artefatos de PCR foram geradas curvas de desnaturação para cada corrida realizada.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na qPCR.

Filo ou Classe	Iniciadores	Referência
Eubacteria (all bacteria)	**F** [5´- AAACTCAAKGAATTGACGG – 3´] **R** [5´- CTCARRCACCGAGCTGAC – 3´]	GREGORIS *et al.*, 2011
Filo *Bacteroidetes*	**F** [5´- CRAACAGGATTAGATACCCT – 3´] **R** [5´- GGTAAGGTTCCTCGCGTAT – 3´]	GREGORIS *et al.*, 2011
Filo *Firmicutes*	**F** [5´- TGAAACTYAAAGGAATTGACG – 3´] **R** [5´- ACCATGCACCACCTGTC – 3´]	GREGORIS *et al.*, 2011
Filo *Actinobacteria*	**F** [5´- TACGGCCGCAAGGCTA – 3´] **R** [5´- TCRTCCCCACCTTCCTCCG – 3´]	GREGORIS *et al.*, 2011
Classe *ɣ-Proteobacteria*	**F** [5´- TCGTCAGCTCGTGTYGTGA – 3´] **R** [5´- CGTAAGGGCCATGATG – 3´]	GREGORIS *et al.*, 2011
Filo *Verrucomicrobia*	**F** [5’ – GAATTCTCGGTGTAGCA– 3’] **R** [5’- GGCATTGTAGTACGTGTGCA – 3’]	HERMANN-BANK *et al.*, 2013

5.3.8. Metabolômica exploratória

O perfil metabólico do soro das voluntárias foi estudado por uma abordagem metabolômica exploratória, realizada por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) com a finalidade de avaliar as alterações que a intervenção com probiótico ou simbiótico poderiam ocasionar no metabolismo das voluntárias.

A abordagem exploratória foi realizada por meio de uma avaliação global dos metabólitos sem a definição prévia de quais metabólitos seriam estudados. Neste sentido, observamos todos os metabólitos produzidos pelo corpo das participantes do estudo, por meio da amostra de soro, e analisamos aqueles que apresentaram maior alteração após a intervenção, e, por meio da comparação com banco de metabólitos humanos, identidicamos os mesmos (CANUTO *et al.*, 2018).

5.3.8.1. Preparo da amostra de soro

O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional. As amostras de soro das mulheres foram diluídas na proporção de 1:1, sendo 330 µL de soro e 330µL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM com pH de 7,4, 20% de óxido de deutério, e centrifugadas a 10000 x g, a 4ºC por 10 minutos (BECKONERT *et al.*, 2007). Após o preparo da amostra foi pipetado um volume de 600 µL para os tubos de 5 mm específicos para avaliação por RMN (Apêndice IX).

5.3.8.2. Análise metabolômica por RMN

As amostras de soro foram analisadas por RMN para o estudo do metabolôma das voluntárias da pesquisa. Os espectros uni e bi-dimensional de hidrogênio isótopo 1 (^{1}H) dos intermediários metabólicos foram adquiridos com largura espectral (δ) de 12.9836 ppm, 1,74 segundos de atraso de relaxamento e 32 K pontos em equipamento Bruker DRX 500 MHz (Bruker Spectrospin, Karlsruhe, Alemanha) na temperatura de 298 K.

As aquisições foram processadas e normalizadas pelo DSS no *software* TopSpin 3.2 (BrukerBiospin) (FIDALGO *et al.*, 2012) e Metabolab (LUDWIG; GÜNTHER, 2011). O assinalamento dos intermediários metabólicos foi obtido a partir da comparação com espectros referência 1H-1H TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*) e com o auxílio do banco de dados *Human Metabolome Data Base* (WISHART *et al.*, 2007).

Análise de Componentes Principais (PCA) (KEMSLEY *et al.*, 2007) e Análise Parcial Mínima de Discriminação Quadrática (PLS-DA) (PÉREZ-ENCISO; TENENHAUS, 2003) foram conduzidas para explorar os metabólitos e, para validar a

discriminação de classe e, para evitar o sobreajuste foi realizado o teste de permutação (100 permutações) com base na distância de separação, razão B/W e a validação cruzada foi feita por meio do método *Leave-one-out*.

O cálculo das variáveis importantes na projeção (score VIP) e os coeficientes de regressão PLS (loading) para os componentes 1, 2 e 3 foram conduzidos com a finalidade de classificar a importância relativa de cada metabólito. O score VIP reflete o somatório ponderado do quadrado das cargas, e para tal foram considerados para análises aqueles que tivessem um VIP score maior do que 0,2. Já PLS reflete os pesos da quantidade de variação Y em cada dimensão. Os coeficientes de regressão PLS refletem os pesos em função da redução das somas dos quadrados no número de componentes do PLS. Análises multivariadas e a validação do PLS-DA21 foram conduzidas no *Software Metaboanalyst* 3.0 (XIA; WISHART, 2016). Abaixo encontra-se uma figura resumindo o fluxo da metabolômica feito no presente estudo (**Figura 6**).

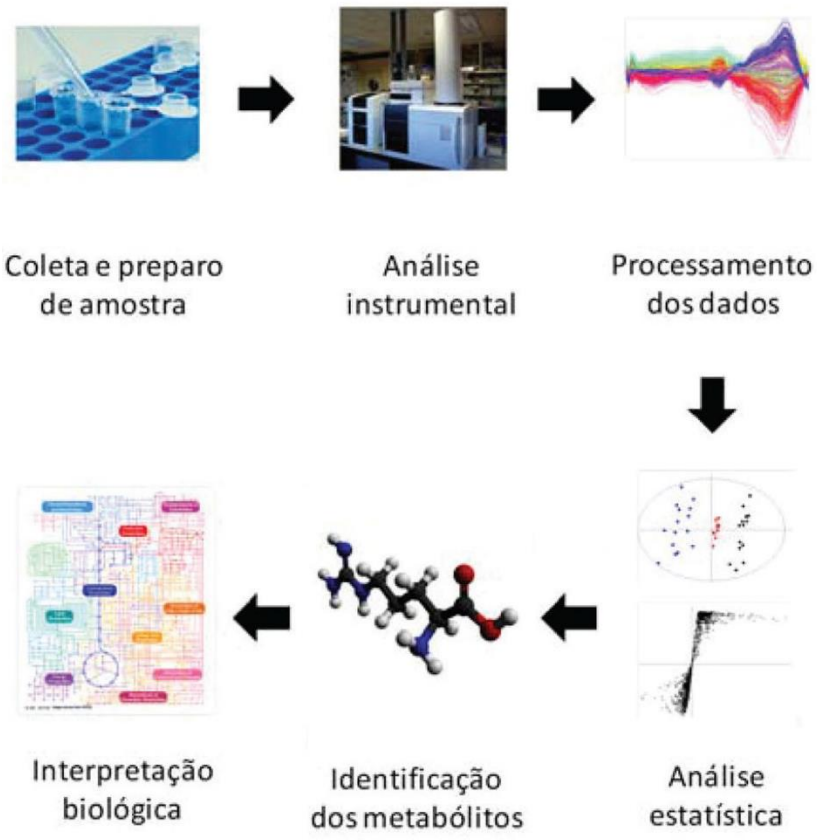


Figura 6. Fluxograma da analíse metabolômica.

Fonte: CANUTO *et al*., 2018

O processo para realização da metabolômica se dá por meio de 6 etapas: a primeira etapa se refere à coleta e preparo das amostras, a segunda à análise da amostra por meio da

RMN, a terceira é o processamento dos dados obtidos na análise das amostras, a quarta é a análise estatística, a quinta é a identificação dos metabólitos de maior importância nas amostras analisadas, e por fim, a sexta etapa é a interpretação biológica.

5.3.9. Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram apresentadas e analisadas na forma de média±desvio padrão ou média±erro padrão (apenas para microbiota intestinal), enquanto as variáveis categóricas na forma de freqüência de ocorrência. Foi adotado como significância $p<0,05$.

Teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar se as variáveis apresentavam uma distribuição normal, para que fosse possível definir pela utilização de testes paramétricos ou não paramétricos. As variáveis apresentaram distribuição normal, sendo definido o uso de testes paramétricos descritos a seguir.

Os dados foram analisados por meio de testes estatísticos utilizando o *software* estatístico *Statistical Package for Social Science* 21.0 (SPSS, *IBM Corporation*, NY). Para comparação entre grupos foram utilizados ANOVA *one-way* com pós teste de Bonferroni para avaliar quais grupos diferiram significativamente entre si. Para as comparações entre os tempos em cada grupo foi utilizado o teste *T-student* (apenas para variáveis laboratoriais) e ANOVA de medidas repetidas (para as demais variáveis).

A análise estatística da composição da microbiota intestinal foi conduzida no *software GraphPad Prism*® 5.01 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA) utilizando o teste ANOVA *one-way* com comparações múltiplas para comparação simultânea entre os diferentes grupos e tempos, e da metabolômica no *MetaboAnalyst* 3.0 (Xia Bab, Montreal, Canadá) por meio de análise multivariada.

Ademais, foram realizadas correlações entre a composição da microbiota intestinal com os metabôlitos e variáveis antropométricas no pacote estatístico *GraphPad Prism*® 5.01 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA) por meio da correlação de Spearman.

6. Resultados

Os resultados da presente tese estão apresentados na forma de manuscritos. A seguir encontram-se os dois manuscritos, produtos do trabalho desenvolvido ao longo do doutorado.

6.1. Manuscrito 1

Effect of *Bifidobacterium lactis* with or without fructooligosaccharide on body weight and gut microbiota composition in women with obesity: a double-blind, controlled, randomized, clinical trial

Louise Crovesy[1], Marjorie Ostrowski[1], Karla Miranda Rodrigues[2], Leandro Araujo Lobo[2], Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues[2], Márcia Soares-Mota[1], Eliane Lopes Rosado[1]

1- Departament of Nutrtion and Dietetics (DND), Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro - campus Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2- Departamento of Medical Microbiology, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro - campus Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Correspondence author:
Louise Crovesy de Oliveira
email: louisecrovesy@yahoo.com.br
telephone: +55 21 3938-6601
fax: +55 21 2280 8343

Abstract

Background: Modulation of gut microbiota has been appointed as possible treatment for obesity and co-morbidities. The aim of study was evaluated the effect of *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) with or without fructooligosaccharide (FOS) on gut microbiota composition, body weight, glycemia, lipid profile and blood pressure of women with obesity, and whether the effect on weight loss and gut microbiota remains 15 days after the end of the intervention.

Methods: A double-blind, parallel, randomized, controlled clinical trial with 32 adults (25-50 years) women with obesity (body mass index (BMI) between 30-34.99 kg/m²) was performed. They were randomized between three groups: probiotic (PG – *B. lactis* and maltodextrin), symbiotic (SG - *B. lactis* and FOS), and control (CG – placebo), receiving low-calorie diet for 60 days. Gut microbiota composition, biochemistry and anthropometric variables were evaluated before and after 60 day of intervention, and gut microbiota composition and body weight were also evaluated 15 days after end of intervention.

Results: After 60 days of intervention, triglycerides decreased (142.5±40.8 vs 111.2±33.4, p=0.028) in PG, body weight (93.0±8.6 vs 90.8±8.4, p=0.027) and BMI (36.3±10.1 vs 35.5±2.1, p=0.033) decreased in SG, and *Verrucomicrobia* increased in SG, compared to baseline. Fifteen days after end of the intervention PG showed increase in *Gamma-Proteobacteria*, compared to other times and groups. PG had lower carbohydrate intake compared to SG, and lower calorie intake compared to other times and CG.

Conclusion: *B. lactis* intake by 60 days appears to decrease triglycerides, and association of *B. lactis* with FOS increased *Verrucomicrobia*, besides to contribute to decrease weight loss. Clinical Trial (https://clinicaltrials.gov/): NCT02505854).

Keywords: obesity, gut microbiota, probiotic, symbiotic, lipid profile

1. Introduction

Obesity is a global public health problem growing in worldwide. This disease affect 650 million of adults in worldwide, being more prevalent in women (15%) compared to men (11%)[1]. Many factors have been appointed as caused of obesity highlighting the gut microbiota.

Firmicutes and *Bacteroidetes* are most predominant phylum of gut microbiota[2]. Studies show difference between gut microbiota composition of individuals with obesity and lean individuals, especially in *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio[3]. *Actinobacteria* is composed by *Bifidobacterium* genus that is associated with balance in gut microbiota and health, especially body weight maintenance. Individuals with obesity have depletion in *Bifidobacterium*[4]. *Verrucomicrobia* is composed only *Akkermansia municiphila* which is related to body weight control, and generally these bacteria are lower in individual with obesity[5]. *Proteobacteria* has been associated to obesity among other diseases, because it is pointed as one of the phyla that correspond to the signature of dysbiosis[6].

Altered profiles of gut microbiota promotes increased of body weight through bacteria-host gene interaction with increase in expression of genes involved in nutrient absorption, and suppression of angiopoietin-like protein 4 increasing triglyceride storage in adipose tissue. In addition, there is reduction in secretion of anorectic hormones (peptide-like glucagon 1 (GLP-1), leptin and peptide YY (PYY)), and increase in insulin resistance in the hypothalamus, furthering low grade inflammation and lower satiety[7].

Gut microbiota modulation by probiotic and symbiotic emerge as adjuvant in obesity control[8]. Some studies about the effect of gut microbiota modulation have shown beneficent effects of probiotics and symbiotics on weight loss, improvement of glycemia, and lipid profile[9-11]. There are few studies exploring the effects of probiotic *Bifidobacterium* on weight loss in humans, and in animal anti-obesity effect of *Bifidobacterium* already was confirmed, being a possible adjuvant in treatment of obesity[12]. Thus, the aim of present study was evaluated the effect of *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) with or without fructooligosaccharide (FOS) insert in low-calorie dietary planning on gut microbiota composition, body weight, glycemia, lipid profile and blood pressure of women affect by obesity, and whether the effect of gut microbiota modulation continue after 15 days end of the intervention.

2. Methods

2.1. Subjects

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital Clementino Fraga Filho of Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (101-14) and registered in the Clinical Trial (https://clinicaltrials.gov/) (NCT02505854). The eligible volunteers signed informed consent term.

Thirty-two women with age 25-50 years and diagnosis of class obesity I and II (body mass index (BMI) between 30 and 39.99 kg/m²) were recruited through dissemination of the research on the website of the Institute of Nutrition in the period from June to October 2015. Pregnant, breastfeeding, smoker, drinker, diagnosis of non-communicable disease, post-bariatric surgery, change in body weight higher 3 kg/m³ within 1 month, use of antidepressants, continuous drugs (except contraceptives), laxatives, antacids, digestive enzymes, H2 blockers, proton-pump inhibitors, antibiotics, herbal drugs, or nutraceuticals were not eligible. Volunteers were oriented to fill 3-day food record, stool collection, research preparation, maintain physical activity and avoid consumption of fermented milk and yogurt 1 week before and during trial clinical.

2.2. Study design

A double-blind, parallel, randomized, controlled clinical trial was conducted with convenience sample. The participants and the study monitor were blinded to the randomization until 15 days after end of the intervention, when all data had been collected. The randomization was done before evaluation through lottery in block of 1:1:1.

The volunteers came to Clinical Analysis of the College of Pharmacy of UFRJ with 12-hour fast for blood collection. After, they were forwarded to Nutrition Assessment Laboratory for anthropometric evaluation, to deliver stool sample and 3-day food records filled. After completing all evaluation, they received the intervention according of group which they were allocated: PG (probiotic – n= 10), SG (symbiotic – n= 11), and CG (control – n= 11). The allocation was done by block randomization of 1:1:1 between three groups. All analysis (gut microbiota composition, anthropometric, biochemistry, blood pressure and dietetic variables) was repeated 60 days after intervention, and gut microbiota composition, anthropometric and dietetic variables were reapeated 15 days after end of the intervention. Compliance to the trial protocol was assessed by remaining capsule and sachet in the returned at days 15, 30, 45, and 60, and through 3-day food records. In addition, we reminder volunteers through cell phones regarding supplements intake.

2.4. Intervention

Intervention consisted in capsules containing 10^9 colony forming units (CFU) of *B. lactis* UBBLa-70 and sachet containing 5g of maltodextrin (PG), capsules with 10^9 CFU of *B. lactis* UBBLa-70 and sachet with 5g of FOS (SG), or capsules with gelatin and sachet with 5g of maltodextrin (CG). All capsules had same size and color. The volunteers were instructed to consume capsules and sachets in the morning with breakfast. All women also received a low-calorie diet, adequate in protein, fat, carbohydrate, and fiber. Calorie restriction was calculated by European Society for Parenteral and Enteral Nutrition formula, considering 23 kcal/kg of weight/day[13].

2.5. Anthropometric, blood pressure and laboratory assessment

Body weight was measured using platform scale Filizola Personal Line 200 model, and BMI was calculated using body weight and height. Waist circumference (WC) was measured at the midpoint between last rib and iliac crest with anthropometric tape Sanny[14]. Blood pressure was evaluated using automatic device Omrom HEM 742 INT model following VI Brazilian Hypertension Guideline protocol[15].

After overnight fasting blood sample were collected and analyzed in Clinical Analysis of the College of Pharmacy. Glycemia[16], total cholesterol (TC)[17], high density lipoprotein cholesterol (HDL-c)[18], and triglycerides (TG)[19] were analyzed by enzymatic colorimetric methods using Glicose PAP Liquiform, Colesterol Liquiform, HDL LE and Triglicérides Liquiform, da Lab test Diagnóstica kits, respectively. Low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was calculated by Friedwald, Levy and Fredrickson formule[20].

2.6. Dietetic assessment, physical activity and side effects

Dietary intake was evaluated by of 3-day food record in baseline and final of intervention, and through 24-hours record after 15 days of conclusion intervention. Calorie, macronutrients, fiber, cholesterol, monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), and saturated fatty acid (SFA) were analyzed by DietPro 5.1i software (A.S. Sistemas, Universidade Federal de Viçosa).

Physical activity was evaluated in baseline and final through short International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) to verify whether volunteers maintain their

physical activity. Women were classified according their activity in active, irregularly inactive or sedentary[21].

Side effects of probiotic and symbiotic were analyzed through Bristol scale[22], that evaluated stool consistence, and Likert scale of 5 points evaluating presence and frequency of symptoms such as abdominal pains, abdominal distension and abdominal discomfort, flatus, borborygmus[23].

2.7. Gut microbiota assessment

Stool samples were brought by volunteers in stool container with ice, and it stored at -80ºC for 1 month until DNA extraction. Bacterial DNA present in the stool samples were extracted by QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) following manufacturer's recommendation. Quantification of different taxa was performed through quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in the StepOnePlus™ System (*Applied Biosystems*®, EUA) using primers targeting the 16S rRNA gene specific for *Firmicutes* (**F** [5´- TGAAACTYAAAGGAATTGACG – 3´]/**R** [5´- ACCATGCACCACCTGTC – 3´])[24], *Bacteroidetes* (**F** [5´- CRAACAGGATTAGATACCCT – 3´]/**R** [5´- GGTAAGGTTCCTCGCGTAT – 3´])[24], *Actinobacteria* (**F** [5´- TACGGCCGCAAGGCTA – 3´]/**R** [5´- TCRTCCCCACCTTCCTCCG – 3´])[24] and *Verrucomicrobia* phylum (**F** [5´- GAATTCTCGGTGTAGCA – 3´]/**R** [5´- GGCATTGTAGTACGTGTGCA – 3´])[25] and *Gamma-Proteobacteria* class (**F** [5´- TCGTCAGCTCGTGTYGTGA – 3´]/**R** [5´- CGTAAGGGCCATGATG – 3´])[24] were evaluated. qPCR reaction conditions considered 45 cycles of 50°C/2 min, 95°C/10 min, 95°C/30 s, and 60°C/1 min. The quantification relative of abundance different bacteria was normalized by ΔCT of total bacteria in sample. The reaction was performed in duplicate for each sample and negative control was evaluated.

2.8. Statistical analysis

Data were presented as mean±standard deviation (age, anthropometric, laboratorial and dietetic variables) or mean±standard error (gut microbiota composition). Analyzed per-protocol was done through Statistical Package for Social Science (SPSS, IBM Corporation, NY) version 21.0 (anthropometric, biochemistry and dietetic variables) and Prism Graphical (GraphPad Software, CA) version 7.0 (gut microbiota composition), considering $p<0.05$ significant. Shapiro-Wilk normality test was performed. All variables had normal distribution, except likert scale. Comparisons between groups were tested by

ANOVA and comparison between times in each group was performed by repeated measures ANOVA test or T-student when variable was evaluated in two times (laboratory variables). Anthropometric, blood pressure and laboratory variables were adjusted by BMI and age.

3. Results

Among 2696 individuals interested in participating of the study, only 177 were eligible, and of these 51 women started the study being randomized among the three groups. However, 32 women completed all the steps of the research, and 21 women returned 15 days after the end of the study (Figure 1). The volunteers showed 34.70 ± 8.99, 35.18 ± 5.58 and 31.45 ± 6.19 years, in PG, SG and CG, respectively, WC[14] and serum concentrations of LDL-c increased, and HDL-c decreased[15] (Table 1).

Data about delivery and feeding of volunteers was be found in supplementary material (Table 1S). The women had similar distribuition between casarean and vaginal delivery, and the gestation time did not differ between groups. In addition, the feeding trhough breastfeeding, infant formula or mixed feeding was similar between groups. These results showed that the women had an influence of delivery and feeding similar on the gut microbiota in the three groups

In the baseline, BMI was higher in SG and TG in PG, both compared to CG. After the intervention, SG presented reduction in body weight and BMI, compared to the baseline. However, these changes did not differ between groups. TG reduced in PG, compared to baseline. Other biochemistry variables, and blood pressure did not differ (Table 1). After adjusting, confounding factors did not influence the variables analyzed.

In the baseline the fiber intake differed between PG and CG, being only adequate in the CG and lower recommendation in the other groups. During intervention the dietary intake of women did not differ. Fifteen days after end of the intervention, caloric intake was lower in SG compared to CG, and carbohydrate was lower in PG than SG. Protein consumption decreased in the SG compared the final to 15 days after the end of study, and the energy was lower 15 days after end of the intervention compared to the baseline period in PG. Both intervention groups showed reduction in calorie intake 15 days after end of the intervention compared to baseline and final, while CG showed increase in calorie intake, however, did not differ between PG and SG (Table 2).

In baseline, the women were classified as active n=8, n=9 and n=11, in PG, SG, and CG respectively, and irregularly in active in PG (n=2), and in CG (n=1). After

intervention 8 in PG, 9 in SG, and 11 in CG were considered active, and 2 in PG and SG were irregularity active. All groups did not differ in physical activity during study.

Gut microbiota composition no differed between groups at the baseline. At the final, *Verrucomicrobia* increased in SG being higher than all groups 15 days after end intervention (Figure 2). Fifteen after end of the intervention PG presented higher amount of *Gamma-Proteobacteria* compared to the other groups and to other times (Figure 2).

Stool consistency of PG maintained the pattern like to baseline, while GS and CG presented a change in consistency with reduction in lumpy consistency and increase in loose consistency, comparing final with baseline. Fifteen days after end intervention PG and CG maintained the consistency stool, SG had women that related lumpy stool. There was no significant difference in the gastrointestinal symptoms between groups (baseline p=0.262, final p=0.494, 15 days after end of the intervention p=0.944) and intragroup (PG p=0.116, SG p=0.367, CG p=0.612). Although there was no difference, some volunteers receiving probiotic or symbiotic reported flatulence at the beginning of the supplementation, finishing symptom during second week of the intervention.

The women who dropout of the study showed similar characteristics to women who completed the study. WC and HDL-c differed, being high WC and low HDL-c in drop out women (Table 2S), however body weight and BMI did not differ between the women. Fiber intake of women who dropout differed to women who completed, being high and adequate in dropout women (Table 3S). Generally, the characteristics of dropouts were like the women who remained until the end of the study.

4. Discussion

Recently, discovery the importance that gut microbiota exercises on body weight and metabolism in humans has been highlighted, appearing as new possibility therapeutic in the treatment of obesity and co-morbidities[7]. We tested the hypothesis that probiotic and symbiotic inserted in a low-caloric dietary planning could help in the loss of body weight, improvement of biochemistry parameters associated to obesity, and beneficent change in the gut microbiota in women with obesity, and whether these effects continue 15 days after use of probiotic and symbiotic.

The present study observed decrease in serum concentrations of triglycerides with *B. lactis*. On the other hand, the association of FOS to *B. lactis* seems to increase the bacteria of phyla *Verrucomicrobia*, besides to contribute with reduction of body weight and BMI. A similar result was found by Stenman et al.[10] who verified reduction in body

weight and BMI in individuals with overweight after 6 months of intervention with symbiotic (*B. lactis* 420 and polydextrose).

Symbiotic promotes increase in the population of *Akkermansia*[5], which can be shown in the present study due to the increase *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*) after the use of the symbiotic; however, to maintain this effect on gut microbiota is necessary use continuous of symbiotic[26]. *Verrucomicrobia* is associated to lean weight because maintain gut barrier and influence other bacteria, favoring beneficial gut bacteria[5]. In addition, *Akkermansia muciniphila* can control the fat mass storage having an important role in obesity[27]. The increase in *Verrucomicrobia* in SG may have been responsible for the discreet weight loss in this group.

On the other hand, *B. lactis* alone did not present the same effect on weight loss when associated with FOS, which corroborates with some studies[10,28]. It seems that the effect of probiotic on body weight is limited and controversial, and its effect depends on the strain used[29].

Both symbiotic and probiotic did not influence biochemistry variables, excepting TG that reduced only in PG. Literature has shown effects of probiotic and symbiotic on these parameters[9,30,31]. However, it seems that beneficial effects on laboratorial variables are found in individuals who present alterations in these paramenters[9,32,33], which was not the case of the participants included in the present study. In addition, the time of intervention was higher (12 weeks or 6 month), and two studies used more than one probiotic strain associated, and amount different[9,30,31].

One of the possible mechanisms by which probiotic improve TG would be by reducing the uptake of TG in the gut promoting reduction of formation and transport of chylomicrons to the liver, besides the activation of beta-oxidation[32].

Gamma-Proteobacteria increased in PG after 15 day of conclusion of the intervention may be caused by the diet of the women. The PG presented a reduction in caloric intake, in addition they had lower carbohydrate intake, but without differing from other times, however differing from SG. It is known that diet can modulate gut microbiota[33]. In addition, gut microbiota composition may be influenced by other factors, including individuality of host, responsible for the differences found in the phylum within the same group [34].

The study presented some limitations, such as the small sample size of women included, due to the careful selection of volunteers whose purpose was to obtain a more

homogeneous population. The large dropout of the study, despite efforts to keep the volunteers in the survey, however, losses were similar among the three groups.

5. Conclusion

The use of capsules containing 10^9CFU of *B. lactis* associated to low-calorie dietary planning for 60 days decreased TG, and when associated to 5g of FOS appear to promote weight loss, besides increase *Verrucomicrobia. Proteobacteria.* increased after stopping probiotic intake. Studies in a size samples higher with more time of intervention is recommended to evaluate the effect of this probiotic and symbiotic on weight loss, glycemia and lipid profile.

6. References

1- World Health Organization (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, 2018, n. 311. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Access on 06/19/2019.

2- Moran CP, Shanahan F. Gut microbiota and obesity: role in aetiology and potential therapeutic tardet. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2014;28:585-597.

3- Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. FEBS Lett. 2014;588:4223-4233.

4- Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, *et al*. Bifidobacteria and their health-promoting effects. Microbiol Spectr. 2017;5.

5- Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. Microb Pathog. 2017;106:171-181.

6- Shi NR, Whon TW, Bae JW. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015;33(9):496-503.

7- Nehra V, Allen JM, Mailing LJ, *et al*. Gut microbiota: modulation of host physiology in obesity. Physiology. 2016;31:327-335.

8- World Gastroenterology Organization. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia – Probioticos e prebióticos. 2017;pp. 35.

9- John GK, Whang L, Nanavanti J, *et al*. Dietary alteration of the gut microbiome and its impact on weight and fat mass: a systematic review and meta-analysis. Genes. 2018;9:e167.

10- Stenman LK, Lehtinen MJ, Meland N, *et al*. Probiotic with or without fiber controls body fat mass, associated with serum zonulin, in overweight and obesity adults – randomized controlled Trial. EBio Medicine. 2016;13:190-200.
11- Bernini J, Simão AN, Alfieri DF, *et al*. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. Nutr. 2016;32:716-719.
12- Carreras NL, Martorell P, Chenoll E, *et al*. Anti-obesity properties of the strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CECT8145 in Zücker fatty rats. Benef Microbes. 2018;9:629-641.
13- Kreymann KG, Berger MM, Deutz NEP, *et al*. ESPEN guidelines on enteral nutrition: intensive care. Clin Nutr. 2006;25:210-223.
14- Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books. 1988.
15- Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, *et al*. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz brasileira de dislipidemia e prevenção da aterosclerose. Arq Bras Cardiol. 2013;101:1-36.
16- Lott JA, Turner K. Evaluation of trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. Clin Chem. 1975;21:1754-1760.
17- Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin Chem. 1973;19:1350-1356.
18- Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, *et al*. Determination of high-density lipoproteins: screening methods compared. Clin Chem. 1979;25:939-942.
19- Mcgowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, *et al*. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin Chem. 1983;29:538-542.
20- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18:499-502.
21- Matsudo S, Araújo T, Matsudo V, *et al*. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validação e reprodutibilidade no Brasil. Rev Bras Ativ Fis Saúde. 2001;6:5-18.
22- Heaton KW, Radvan J, Cripps H, *et al*. Defecation frequency ad timing, and stool form in the general population: a prospective study. Gut. 1992;33:818-824.

23- Guynnet D, Schlumberger A, Mhamdi L, *et al*. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and digestive symptons in women reporting minor digestive symptoms: a randomized, double-blind, parallel, controlled study. Br J Nutr. 2009;102:1654-1662.
24- de Gregoris TB, Aldred N, Clare AS, *et al*. Improvement of phylim- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. J Microbiol Methods. 2011;86:351-356.
25- Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, *et al*. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. BMC Genomics. 2013;14:788.
26- Everard A, Belzer C, Geurts L, *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(22):9066-9071.
27- Guarner F, Khan AG, Garisch J, *et al*. World Gastroenterology Organization Global Guidelines: probiotics and prebiotisc October 2011. J Clin Gastroenterol. 2012;46:468-481.
28- Bomhof MR, Saha DC, Reid DT, *et al*. Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis* on gut microbiota and glycemia in obese rats. Obesity. 2014;22:763-771.
29- Rerksuppaphol S, Rerksuppaphol L. A randomized double-blind controlled trial of *Lactobacillus acidophilus* plus *Bifidobacterium bifidum versus* placebo in patients with hypercholesterolemia. J Clin Diagn Res. 2015;9:KC01-4.
30- Tajabadi-Ebrahimi M, Sharifi N, Farrokhian A, *et al*. A randomized controlled clinical Trial investigating the effect of synbiotic administration on makerts of insulin metabolism and lipid profiles in overweight type 2 diabetic patients with coronary heart disease. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2017;125:21-27.
31- Kassaian N, Feizi A, Aminorroaya A, *et al*. The effects of probiotics and synbiotic supplementation on glucose and insulin metabolism in adults with prediabetes: a double-blind randomized clinical trial. Acta Diabetol. 2018;55:1019-1028.
32- Hamad EM, Sato M, Uzu K, *et al*. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. Br J Nutr /.2009;101:716-724.

33- Haro C, García-Carpintero S, Rangel-Zúñiga AO, *et al*. Consumption of two dietary patterns restored microbiota dysbiosis in obese patients with metabolic dysfunction. Mol Nutr Foods Res. 2017;61.
34- De Muinck EJ, Trosvik P. Individuality and convergence of the infant gut microbiota during the first year of life. Nat Commen. 2018;9:2233.

Abbreviation

B. lactis – Bifidobacterium lactis
CFU – colony forming units
CG – control group
DNA – deoxyribonucleic acid
FOS – frutooligosaccharide
GLP-1 – glucagon-like peptide 1
HDL-c – high-density lipoprotein cholesterol
LDL-c – low-density lipoprotein cholesterol
MUFA – monounsaturated fatty acid
PG – probiotic group
PUFA – polyunsaturated fatty acid
PYY – peptide YY
RT-PCR – real-time polymerase chain reaction
SFA – saturated fatty acid
SG – symbiotic group
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences
TC – total cholesterol
TG – triglycerides
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
WC – waist circumference

Acknowledgments: The authors thank the Officilab pharmacy for filling sachets in on search
Conflicts of interest: none
Financial support: This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance code 001,

and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj). The funders were not involved in the design until publication of study.

Authorship: conception and design of the study (all authors); acquisition of data, or analysis and interpretation of data (LCO, KRM), drafting the article (all authors) final approval of the version to be submitted (all authors).

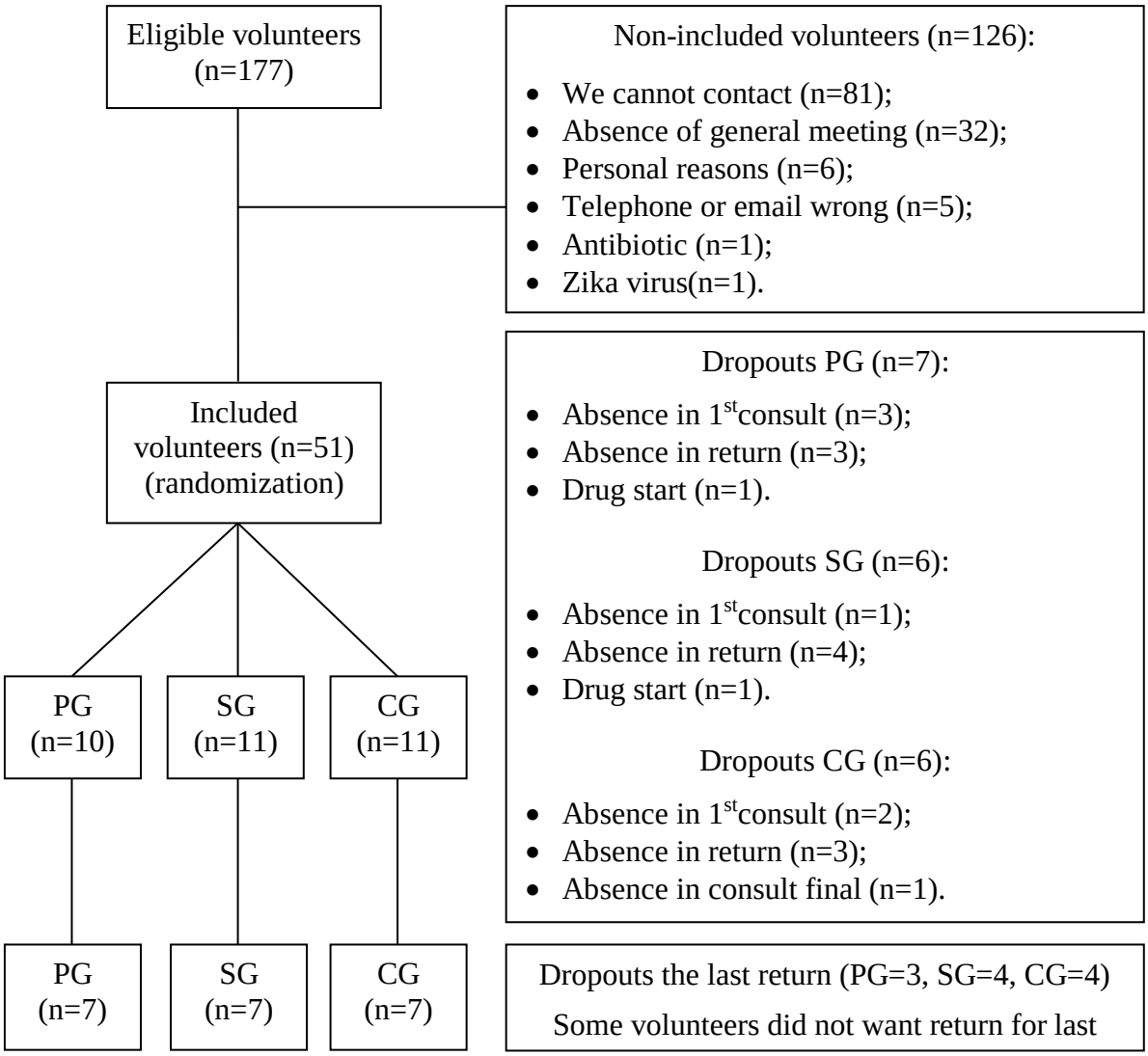


Figure 1. Flow chart of volunteers' selection of the study

Legend: PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG: control group; BMI: body mass index; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

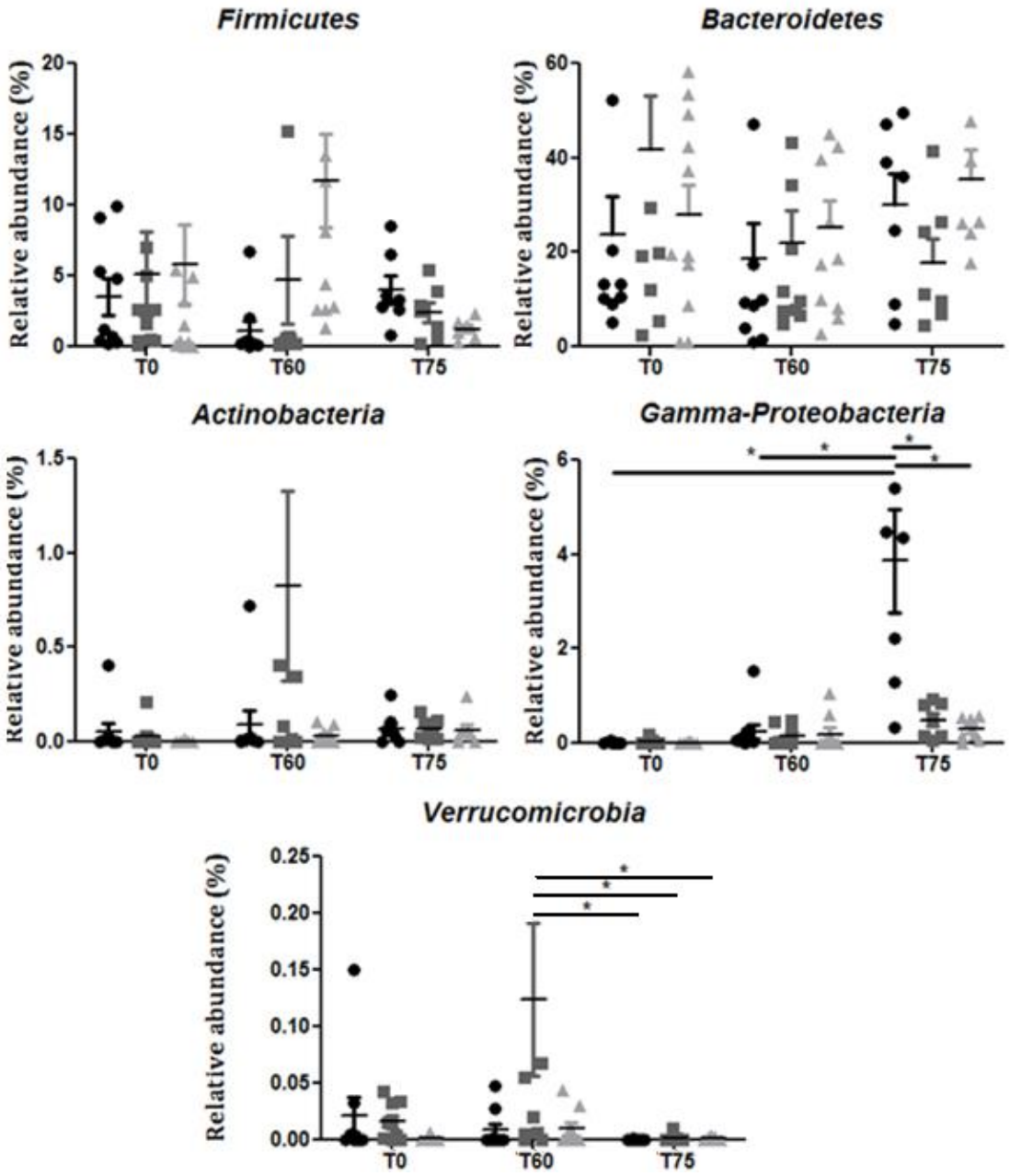


Figure 2. Comparison of gut microbiota composition between the groups and times

Legend: T0: baseline; T60: final; T75: 15 days after end of the intervention; ●: probiotic group; ■: symbiotic group; ▲: control group; * $p<0.005$.

Values are expressed as media±standard error. Comparison between groups was performed by ANOVA test.

Table 1. Characterization and comparison of anthropometric, blood pressure, and laboratory variables between groups in different times

Variables	Time	PG	*p*-value[#]	SG	*p*-value[#]	CG	*p*-value[#]	*p*-value[+]
Weight (kg)	T0	87.7±10.4	0.515	93.0±8.6	**0.027**[*a]	88.7±14.2	0.109	0.523
	T60	87.1±11.0		90.8±8.4		87.4±15.0		0.725
	T75	87.1±12.4		91.7±10.4		87.3±11.5		0.699
BMI (kg/m²)	T0	33.5±2.4	0.493	36.3±10.1	**0.033**[*a]	33.8±3.1	0.104	**0.030**[*1]
	T60	33.3±2.5		35.5±2.1		33.2±3.4		0.112
	T75	34.1±2.4		35.6±2.0		33.5±3.5		0.350
WC (cm)	T0	99.3±6.1	0.943	98.4±9.0	0.134	94.5±10.7	0.167	0.432
	T60	98.5±7.8		96.62±8.2		92.7±12.1		0.374
	T75	101.4±6.3		95.1±3.8		92.6±10.4		0.094
SBP (mmHg)	T0	117.4±18.5	0.739	120.0±9.2	0.497	121.0±11.3	0.482	0.795
	T60	119.3±16.5		112.4±10.8		115.9±13.2		0.568
	T75	119.1±21.4		114.1±7.0		116.5±13.2		0.824
SBP (mmHg)	T0	83.7±7.6	0.460	78.4±8.3	0.372	81.9±8.5	0.455	0.776
	T60	82.4±7.0		74.4±5.1		76.6±7.7		0.232
	T75	81.3±7.8		75.4±4.1		75.6±7.4		0.197
TC (mg/dL)	T0	190.8±32.6	0.729	171.8±37.7	0.403	186.6±29.7	0.636	0.400
	T60	187.90±39.82		165.0±29.2		184.4±22.8		0.202
LDL-c (mg/dL)	T0	120.5±38.6	0.675	108.3±29.3	0.407	116.8±20.5	0.672	0.635
	T60	117.6±36.2		103.0±28.0		115.3±19.2		0.451
HDL-c (mg/dL)	T0	47.8±8.6	0.945	44.7±7.8	0.404	47.2±12.5	0.706	0.751
	T60	47.9±9.9		42.8±9.2		46.6±10.71		0.482
TG (mg/dL)	T0	142.5±40.8	**0.028**[*]	94.2±35.1	0.842	113.2±34.7	0.734	**0.019**[*1]

	T60	111.2±33.4		95.8±34.7		116.6±45.6		0.432
Glycaemia	T0	93.1±6.0		94.6±8.3		93.6±5.7		0. 574
			0.140		0.871		0.350	
(mg/dL)	T60	89.0±6.4		93.4±6.6		90.8±7.4		0.077

Legend: PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG: control group; T0: baseline; T60: final of intervention; T75: 15 days after end of the intervention; BMI: body mass index; WC: waist circumference; TC: total cholesterol; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; [#]**:**repeated-measure ANOVA;[+]: ANOVA; [*]**:***p*-value < 0.05.

Differences between groups were evaluated by ANOVA ([1]PG x SG, [2]PG x CG, [3]SG x CG). Differences between times were evaluated by repeated measure ANOVA ([a]T0 x T60, [b]T0 x T75, [c]T60 x T75) to anthropometric and blood pressure variables, and T-student to laboratory variable.

Table 2. Dietary intake, comparison between groups and in different times

Variables	Time	PG	*p*-value[#]	SG	*p*-value[#]	CG	*p*-value[#]	*p*-value
Calorie (kcal)	T0	1791.88±613.35	**0.027**[*b]	1600.72±408.59	0.557	1502.92±567.20	0.171	0.234
	T60	1494.82±550.25		1379.05±456.32		1269.53±400.26		0.326
	T75	1254.81±358.76		1144.94±400.53		1792.22±420.85		**0.015**[*3]
Carbohydrate (%)	T0	52.40±11.06	0.462	51.61±9.26	0.214	50.50±12.98	0.490	0.807
	T60	50.27±8.69		52.31±9.42		51.15±8.24		0.805
	T75	46.10±10.61		62.76±13.54		50.71±10.33		**0.040**[*1]
Protein (%)	T0	18.91±7.78	0.213	16.33±5.35	**0.017**[*c]	18.60±5.86	0.089	0.299
	T60	21.97±5.82		18.93±6.37		21.87±6.54		0.244
	T75	24.05±7.41		15.89±6.74		18.28±5.72		0.089
Protein (g/kg of weight)	T0	0.92±0.42	0.487	0.73±0.24	**0.011**[*c]	0.73±0.32	0.514	0.072
	T60	0.94±0.37		0.74±0.3		0.75±0.28		0.083
	T75	0.88±0.42		0.50±0.26		0.94±0.34		0.061
Fat (%)	T0	27.93±6.46	0.196	31.09±8.04	0.302	31.13±10.81	0.195	0.316
	T60	27. 44±6.11		27.89±6.39		27.19±5.85		0.809
	T75	30.58±6.94		22.79±8.19		31.62±6.58		0.071
Fiber (g)	T0	15.39±7.90	0.192	15.09±9.57	0.804	20.92±9.45	0.527	**0.049**[*2]
	T60	17.99±8.32		16.28±8.79		14.60±8.00		0.434
	T75	10.40±.3.37		13.97±7.73		18.58±8.20		0.106
Cholesterol (mg)	T0	244.32±157.71	0.513	223.48±130.29	0.058	346.22±274.45	0.574	0.105
	T60	303.68±308.07		206.22±127.79		275.68±169.69		0.274
	T75	273.69±156.16		130.63±120.98		205.13±77.76		0.120
MUFA (%)	T0	8.15±2.60	0.186	9.59±3.67	0.281	9.61±3.75	0.484	0.152

	T60	8. 81±2.79		8.33±2.35		8.64±2.64		0.837
	T75	9.77±2.87		7.23±3.41		8.63±2.17		0.277
	T0	6.35±3.37		5.59±3.07		6.66±2.87		0.504
PUFA (%)	T60	6.33±2.19	0.344	6.09±2.63	0.070	5.74±2.00	0.342	0.648
	T75	6.34±2.15		4.55±2.53		7.98±4.54		0.170
	T0	9.28±2.44		10.41±4.07		10.21±4.64		0.527
SFA (%)	T60	9.06±2.68	0.094	8.60±3.85	0.405	9.47±2.68	0.608	0.741
	T75	10.04±2.70		8.13±2.67		10.07±1.39		0.232

Legend: PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG: control group; T0: baseline; T60: final of intervention; T75: 15 days after end of the intervention; MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid; SFA: saturated fatty acid; [#]**:** repeated-measure ANOVA;[+]: ANOVA; [*]**:***p*-value < 0.05.

Differences between groups were evaluated by ANOVA ([1]PG x SG, [2]PG x CG, [3]SG x CG). Differences between times were evaluated by repeated measure ANOVA ([a]T0 x T60, [b]T0 x T75, [c]T60 x T75) to anthropometric and blood pressure variables.

Supplementary material

Table 1S. Data on the type of delivery and feeding of the volunteers

Variables	PG (n=10)	SG (n=11)	CG (n=11)
Cesarean delivery (n)	4	4	5
Time (mean±SD)	36.40±6.07	37.00±7.39	40.67±1.63
Vaginal delivery (n)	5	7	6
Time (mean±SD)	40.40±0.89	40	40
Breastfeeding (n)	8	10	9
Infant formula feeding (n)	-	1	1
Mixed feeding (n)	2	-	-

Legend: PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG: control group; SD: standard deviation.

Footnote: In PG and SG one women did not know to inform whether receive infant formula feeding too, and in CG one women did not know to inform the type of feeding.

Table 2S. Comparison of age, anthropometric, and laboratory variables between women who completed and dropped out of the study

Variables	Completed (n=32)	Drop out (n=19)	*p*-value*
Age (years)	33.75±6.98	34.08±8.14	0.990
Body weight (kg)	89.86±11.23	92.35±11.93	0.726
BMI (kg/m²)	34.57±2.80	34.66±2.70	0.940
WC (cm)	97.36±8.87	103.88±5.41	**0.008**
SBP (mmHg)	118.69±12.31	122.07±11.43	0.234
DBP (mmHg)	79.97±8.34	80.54±7.31	0.555
TC (mg/dL)	182.84±33.47	175.08±36.74	0.531
LDL-c (mg/dL)	115.03±29.57	103.38±39.00	0.293
HDL-c (mg/dL)	46.53±9.66	39.69±5.42	**0.030**
VLDL (mg/dL)	23.15±8.17	32.00±15.07	0.069
TG (mg/dL)	115.81±40.82	160.61±75.15	0.057
Glycaemia (mg/dL)	93.81±6.61	96.08±8.24	0.539
HbA1c (%)	5.15±0.43	5.11±0.46	0.743
FFM (kg)	49.56±5.37	50.88±6.12	0.582
BFM (%)	44.71±2.01	44.71±2.01	0.822

Legend: BMI: body mass index; WC: waist circumference; TC: total cholesterol; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; *:*p*-value < 0.05.

The distribution was not normal and the Mann-Whitney U test was performed to compared the groups.

Table 3S. Comparison of dietary intake between women who completed and dropped out of the study

Variables	Completed (n=32)	Drop out (n=19)	*p*-value*
Energy (Kcal)	1644.80±558.82	1915.56±733.25	0.074
Carbohydrate (%)	51.47±11.13	49.25±8.91	0.147
Protein (%)	18.05±6.47	18.94±6.04	0.372
Fat (%)	30.01±8.65	31.55±8.27	0.361
Fiber (g)	17.32±9.38	21.32±10.32	**0.036**
Cholesterol (mg)	274.69±204.50	357.66±463.63	0.162
MUFA (%)	9.11±3.39	9.47±3.37	0.689
PUFA (%)	6.22±3.09	6.53±2.73	0.324
SFA (%)	10.01±3.80	11.09±3.39	0.100

Legend: MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid; SFA: saturated fatty acid; *:*p*-value < 0.05.

The distribution was not normal and the Mann-Whitney U test was performed to compared the groups.

6.2. Manuscrito 2

Modulation of the gut microbiota, ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance metabolite profile and weight loss in women with obesity: a randomized controlled clinical trial

Louise Crovesy[1], Tatiana El-Bacha Porto[1], Eliane Lopes Rosado[1]

1- Departament of Nutrition and Dietetics (DND), Josué de Castro Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro. 373 Carlos Chagas Filho Avenue, block J, second floor, room 24. University City, Fundão Island, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* Correspondence author:
Eliane L. Rosado
email: elianerosado@nutricao.ufrj.br
telephone: +55 21 3938-6601
fax: +55 21 2280 8343

Abstract

Introduction: Gut microbiota modulation may to help in the treatment of obesity improving the microbiota-host metabolism interaction. We aimed to evaluate the effects of gut microbiota modulation by probiotic or symbiotic on body weight and metabolomics profile of women with obesity.

Method: A double-blind, parallel, randomized, controlled clinical trial was conducted with 32 adult women (25-50 years) with body mass index (BMI) between 30 and 34.9 kg/m². Volunteers received low-caloric diet and intervention during 8 weeks according to the group: (probiotic group (PG), n = 10) capsules containing 10^9 colony forming units (CFU) of *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) and sachets with 5 g of maltodextrin, (symbiotic group (SG), n = 11) capsules with 10^9 CFU of *B. lactis* and sachets with 5 g of fructooligosaccharide (FOS), or (control group (CG, n = 11) capsules and sachets placebo. Anthropometric, gut microbiota composition and, metabolic profile were analyzed before and after the intervention.

Results: After 8 weeks, SG had great distinction in global metabolomics profile, with decrease in glycerol, branched-chain amino acid (BCAA), citrate and isoleucine, and increase in pyruvate, arginine, glutamine and alanine. PG showed decrease in metabolites associated to lipids. In PG, negative correlation was found between *Verrucomicrobia* with lactate (r= -0.717, *p*= 0.037) and $(CH_2)_n$ lipids (r= -0.750, *p*= 0.026), *Firmicutes* with VLDL/LDL (r=-0.717, *p*=0.037), $(CH_2)_n$ lipids (r= -0.783, *p*= 0.017), and positive correlation between *Verrucomicrobia* with isoleucine (r= 0.733, *p*=0.031), *Firmicutes* with isoleucine (r= 0.733, *p*= 0.031) and BCAA (r= 0.733, *p*= 0.031) (r= -0.717, *p*= 0.037). In SG, positive correlation was observed between *Bacteroidetes* with glycerol (r = 0.684, *p*=0.035), and negative correlation between fat mass with glutamine (r= -0.6895, *p*=0.0224) and arginine (r= -0.7078, *p*=0.018).

Conclusion: Probiotic decreased metabolites associated to lipids, while symbiotic (*B. lactis* with FOS) showed greater changes in metabolites, with decreased in BCAA and glycerol, and increase in arginine and glutamine. In addition, microbiota composition and fat mass had correlation with some metabolites. Clinical Trial: NCT02505854

Keywords: probiotic, symbiotic, obesity, gut microbiota, metabolomic

1. Introduction

Obesity is the most prevalent diseases in the world and factor risk for other noncommunicable diseases. This disease has been increases concern about it. It is difficult to treat because it has multiple causes, including the composition of gut microbiota[1].

Studies comparing gut microbiota of individuals with obesity with lean individuals have shown that the composition is different[2]. Individuals affected by obesity show increase in the phyla *Firmicutes* and *Proteobacteria*, pointed as causes of dysbiosis[3,4], and reduction in *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*, that would have protective effect against the gain of body weight[5,6].

This change in the microbiota is capable of causing changes in host metabolism It is known that the individual with obesity has alterations in the metabolites, especially with increase in branched-chain amino acid (BCAA)[7], and this alteration appears to be related to the microbiota[8]. According to Liu et al.[9] *Bacteroidetes* decreased is associated with increase of BCAA. Some bacteria belonging *Bacteroidetes* (*B.*) phylum as *B. thetaiotaomicrom* and *B. ovatus* ferment BCAA. For this reason, decreased these bacteria may be associated with increase of BCAA[9].

Gut microbiota modulation has been emerging as new target in treatment of obesity. Probiotic and symbiotic have been shown positive results on weight loss and improvement of lipid profile and glycemia control[10-14]. In addition, an experimental study showed that gut microbiota modulation can change metabolomic profile of individual with obesity[9].

We aimed evaluated the influence of probiotic (*Bifidobacterium latcis* (*B. lactis*)) and symbiotic (*B. lactis* e fructooligosaccharide (FOS)) on gut microbiota composition, and effect of modulation on weight loss, and metabolomic profile of women with obesity.

2. Method

2.1.Ethical and eligibility criteria

The present study was approved by Research Ethics Committee of the University Hospital Clementino Fraga Filho of Federal University of Rio de Janeiro (101-14) and registered in Clinical Trial https://clinicaltrials.gov/ (NCT02505854). All women that participated this study signed the consent form.

Women living in the city of Rio de Janeiro were recruited by dissemination of research on the internet and selected after screening through form filled. Women in premenopausal, no pregnant or breastfeeding, no smoker or drinker, without chronic

disease diagnosis, post-bariatric surgery, that had change weight (gain or loss > 3 kg) in the last 3-month, no use chronic drugs, antidepressant, drugs that change function of gastrointestinal tract, herbal drug, functional food were eligibility.

2.2.Study design and intervention

A double-blind, randomized, controlled, parallel clinical trial was conducted. Women came in the laboratory after overnight fasting for blood collect. After, they were sent to Nutritional Evaluation Laboratory to do anthropometric evaluation, to delivery fecal sample and 3-day record by volunteers, and answer questionnaires. All analysis was repeated after 8-week of intervention.

After all evaluation, the volunteers received the low-calorie diet[15] with macronutrients adequate, and intervention corresponding to their groups: probiotic group (PG) received capsules containing 10^9 colony forming unit (CFU) of *B. lactis* and sachet containing 5g of maltodextrin, symbiotic group (SG) received capsules with 10^9 CFU of *B. lactis* and sachet with 5g of FOS, and control group (CG) received capsules with gelatin and sachet with 5 g of maltodextrin. The capsules and sachet had same amount, size and color.

2.3.Anthropometric and dietetic variables

Body weight was evaluated by scale Filizola Personal Line 200 model. BMI was calculated through the formula body weight (kg) divided by height squared (m^2). Waist circumference (WC) was evaluated in mindpoint between iliac crest and last rib by inelastic anthropometric tape Sanny[16]. Body composition was evaluated by electrical bioimpedance, and the data obtained were used to calculate fat free mass (FFM) by Segal et al.[17], and difference between body weight and FFM found body fat mass (BFM). Dietary intake before and during the study was evaluated by 3-day dietary record and analyzed by Dietpro 5i software.

2.4.^{1}H NMR serum metabolomics

Sample for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis were prepared through dilution of 330 µL of serum sample in 330 µL 100mM sodium phosphate buffer solution and centrifuged at 10000 x g at 4ºC for 10 minutes[18]. A total 600 µL was pipette into the specific tubes for NMR. Hydrogen isotope 1 (1H)-NMR spectra of serum were obtained at Bruker DRX 500 MHz equipment (Bruker Spectrospin, Karlsruhe, Germany). One-

and two-dimensional 1H-NMR spectra were processed using TopSpin 3.2 software (Bruker Biospin)[19] and compared to database Human Metabolome Data Base[20]. We used Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA). To validate class discrimination and avoid overfitting, we validated the PLS-DA using permutation test (100 permutations) based on separation distance, B/W-ratio and cross-validation by leave-one-out method. To rank the relative importance of each metabolite we calculated the variable importance in the projection (VIP-score) and the PLS-regression coefficients for components 1, 2 and 3. VIP scores reflects the weighted sum of square of the PLS loadings and it weights the amount of Y-variance in each dimension. The regression coefficients reflect the weights as a function of the reduction of the sums of the squares across the number of PLS components. We used MetaboAnalyst 3.0 for all multivariate analysis and PLS-DA validation[21].

2.5.Gut microbiota composition

DNA extraction was performed in 200mg of fecal sample using QIAamp fast DNA stool mini Kit of the Biotech following manufacturer's recommendation. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies) to evaluate *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia* phylum and γ-*Proteobacteria* class, using primers made available by Gregoris et al.[22] and Hemrann-Bank[23].For this the equipment was programmed to do 45 cycles of 50ºC /2 min, 95°C/10 min, 95°C/30s, and 60°C/1 min. The quantification of relative abundance was normalized by ΔCT of total bacteria.

2.6.Statistical analysis

Statistical analysis was performed in Statistical Package for the Social Science (SPSS) software version 21.0 for anthropometric and dietetic variables, and Prism Graphical version 7.0 for gut microbiota and metabolomic variables. Comparison between groups was conducted using ANOVA one-way, considering significant $p<0.05$, and comparison between groups for gut microbiota was performed by Kruskall Wallis, and when significant ($p<0.05$) was conducted by Mann Whitney U test compared the groups two by two. Spearman correlation was performed to understand the relationship between the changes in the gut microbiota and in body composition after the interventions.

3. Results

Among 2696 people interested in the study, only 177 were eligible. However, 51 women were randomized between three groups and started the research, being 32 women only concluded 8 weeks of intervention (Figure 1). Women who completed the study had a mean age of 34.70±8.99, 35.18±5.58 and 31.45±6.19 years in the PG, SG and CG, respectively, obesity non-severe with by abdominal obesity (Table 1). In addition, they showed good adherence to treatment intaking approximately 90% for capsules and sachets.

At baseline, BMI differ between groups, being BMI higher in SG compared to PG. In addition. However, there were no differences in anthropometric variables between groups (Table 1). And metabolomic profile was similar between groups although the BMI differ between groups (Supplementary figure 1). Food intake was hypocaloric, adequate in carbohydrate, protein and fat, and poor in fiber (PG and SG), differing significantly only between CG and SG, at the baseline. After 8 weeks of intervention, all women decreased caloric intake and had inadequate fiber intake (Table 1)[24].

After 8 weeks of intervention, we found great distinction global metabolomics profile in the SG compared to other groups (Figure 2). It appears that only low-calorie diet (CG) had greater distinction in metabolic profile than probiotic associated to low-calorie diet (Figure 2). Metabolites with higher contribution in each group at baseline and final by PLS-DA are showed in Figure 3. Among these metabolites, glycerol decreased, and arginine, glutamine and 2-oxoisovalerate increased in all groups. SG showed pyruvate, alanine, polyamine increased, and citrate, isoleucine and BCAA decreased. PG had metabolites associated to lipids decreased (Figure 3).

No correlation between the changes in microbiota and metabolites in CG. In the PG, negative correlations were found between the changes in lactate and $(CH_2)_n$ lipids (r=-0.717, *p*= 0.037; r=-0.750, *p*= 0.026, respectively), and positive correlation between *Verrucomicrobia* and isoleucine (r=0.733, *p*=0.031). In addition, PG showed negative correlation between changes in *Firmicutes* with changes in VLDL/LDL (r=-0.717, *p*=0.037), $(CH_2)_n$ lipids (r= -0.783, *p*= 0.017), and positive correlation with changes in isoleucine and BCAA as a whole (r=0.733, *p*= 0.031; r=-0.717, *p*= 0.037, respectively). In the SG, a positive correlation was observed between the changes in *Bacteroidetes* and serum glycerol (r =0.684, *p*=0.035).

No correlation was found between the changes in metabolites with changes in BMI, total weight and waist circumference in any of the intervention groups. However,

in the SG, negative correlation was observed between the changes in % of fat mass with changes in glutamine (r=-0.6895, *p*=0.0224) and arginine (r=-0.7078, *p*=0.018). These results indicate that the decrease in fat mass was followed by an increase in serum glutamine and arginine.

4. Discussion

Recent studies have shown the role of gut microbiota in several diseases, including obesity[25], through disturbing the host metabolism[7]. There is relationship between gut microbiota composition and host metabolism, being important to maintain the symbiosis between microbiota and host for homeostasis of metabolism[7]. In the present study we hypothesized beneficial modulation of gut microbiota by probiotic or symbiotic could lead to weight loss and improvement in host metabolism.

As results we found discret change in metabolic after probiotic intake, while symbiotic had the largest weight loss than other group, but no significance, and higher changes in the metabolic profile. In addition, CG showed greater change in metabolites compared to PG. In addition, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* and fat mass showed correlation with some metabolites in probiotic and symbiotic groups.

BCAA increased is associated with obesity and IR[9]. She et al.[26] performed study in rats and found higher BCAA catabolism in liver and adipose tissue, favoring increase of BCAA in plasma. In contrast these authors showed reduction of BCAA in humans after bariatric surgery. In the present we observed discreet weight loss in women of SG and reduction in this metabolite. In addition, positive correlation between BCAA and *Firmicutes* was found in PG. *Firmicutes* have been associated to dysbiosis and development of obesity and diabetes[3]. Lower-BCAA intake in a small meal appears to modulate the microbiota, reducing Firmicutes, and improvement insulin sensitivity and fat tissue metabolism[27]. These results showed the role of *Firmicutes* in BCAA metabolism.

Isoleucine belongs to the BCAA class and had a positive correlation with *Verrucomicrobia* and *Firmicutes*. An experimental study supplemented mice with isoleucine and showed improvement in lipid and glucose metabolism and decreased in blood glucose and body fat. Furthermore, the isoleucine supplementation led to adequate microbiota in the mice[28]. *Verrucomicrobia* is related to health and normal weight[5], while *Firmicutes* with dysbiosis and obesity[3], which is controversial isoleucine has positive correlation with both phylum. On the other hand, BCAA increase is associated to obesity,

and it could to speculate that combined increase in isoleucine, leucine and valine, but no isoleucine only, could harm health and favor obesity.

Glutamine showed discriminatory increase in all groups after 8 weeks of intervention and was negatively associated with the change in fat mass in the SG. These results might be discussed in the light of a decrease inflammatory state after 8 weeks of intervention, particularly after symbiotics supplementation[29]. Oral supplementation of glutamine has been associated with benefic changes in the gut microbiota[30]. Another result that corroborated with decrease inflammation following the intervention, particularly in SG, was increase in serum arginine, which was negatively correlated with the decrease in fat mass. A decrease in plasma arginine, as discussed for glutamine, has also been associated with inflammatory responses and oxidative stress in women with obesity[31].

Interestingly, a positive correlation was found between the changes in *Bacteroidetes* and serum glycerol in the SG, which might seem contradictory at first as an increase in glycerol was associated with unhealthy changes in the gut microbiota and increased lipolysis by the adipose tissue and inflammation[32]. However, as our results showed that serum glycerol content decreased in all groups after intervention, the causal association between the changes in *Bacteroidetes* and this metabolite needs to be further investigated. Indeed, Chiadak et al.[33] showed lipopolysaccharide activation decreased glycerol permeability in adipose tissue, leading to an increase in triacylglycerol in adipocytes. Gut microbiota modulation can revert this negative effect on glycerol metabolism, improving lipolysis.

Correlation analyses showed interesting results where negative associations of *Verrucomicrobia* with lactate and lipids and positive association with isoleucine were observed in the PG. A decrease in lactate production has been associated with decreased activation of human adypocytes[34]. *Verrucomicrobia* has been associated to health and anti-inflammatory profile[5], and its effect on lactate corroborates the improved metabolism in these women.

Polyamine decreased is associated to obesity and type 2 diabetes through disturbance in energy, lipid and glucose metabolism[34]. Gut microbiota able play to produce polyamine using by host[35]. Study showed that administration of exogenous spermine in rats improved glucose control and weight loss[36]. Thus, modulation of gut microbiota by prebiotic or fermented fiber increases polyamine[35] canning cause weight

loss[36]. SG showed higher weight loss although no significant differ, which may have occurred due to microbiota modulation and polyamine increase.

5. Conclusion

Daily intake for 8 weeks of low-caloric diet associated with probiotic *B. lactis* decreased metabolites associated to lipids, while symbiotic (*B. lactis* with FOS) showed greater changes in metabolites, with attenuation in overall inflammation and decrease in body weight, particularly in fat mass. In addition, low-calorie *per se* is able to change the metabolic profile in women with obesity.

6. References

1- World Health Organization (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, n. 311, 2018. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Accessed on May 27, 2019.

2- Castaner O, Goday A, Park YM, et al. The gut microbiome profile in obesity: a systematic review. Int J Endocrinol. 2018;2018:40955789. DOI: 10.1155/2018/4095789.

3- Ibrahim M, Anishetty S. A meta-metabolome network of carbohydrate metabolism: interactions between gut microbiota and host. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 428(2):278-284. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.045.

4- Shi NR, Whon TW, Bae JW. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015;33(9):496-503. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

5- Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. MicrobPathog. 2017;106:171-181. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.

6- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(31):11070-11075. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.

7- Bagheri M, Djazzayery A, Farzadfar F, et al. Plasma metabolomic profiling of amino acids and polar lipids in Iranian obese adults. Lipids Health Dis. 2019;18(1):94. DOI: 10.1186/s12944-019-1037-0.

8- Ottosson F, Brunkwall L, Ericson U, et al. Connection between BMI related plasma metabolite profile and gut microbiota. J Clin Endocrinol Metab. 2018;103(4):1491-1501. DOI: 10.1210/jc.2017-02114.

9- Liu R, Hong J, Xu X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. Nat Med. 2017;23(7):859-868. DOI: 10.1038/nm.4358.

10- Eslamparast T, Zamani F, Hekmatdoost A, et al. Effects of synbiotic supplementation on insulin resistance in subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. Br J Nutr. 2014;112(3):438-445. DOI: 10.1017/S0007114514000919.

11- He J, Zhang F, Han Y. Effect of probiotic on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes. Medicine. 2017;96(51):e9166. DOI: 10.1097/MD.0000000000009166.

12- Borgeraas H, Johnson LK, Skattebu J, et al. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Obes Rev. 2018;19(2):219-232. DOI: 10.1111/obr.12626.

13- Hadi A, Alizadeh K, Hajianfar H, et al. Efficacy of synbiotic supplementation in obesity treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Cri Rev Food Sci Nutr. 2018;30:1-13. DOI: 10.1080/10408398.2018.1458021.

14- Hibberd AA, Yde CC, Ziegler ML, et al. Probiotic or symbiotic alters the gut microbiota and metabolism in a randomized controlled trial of weight management overweight adults. Benef Microbes. 2019;10(2):121-135. DOI: 10.3920/BM2018.0028.

15- Kreymann KG, Berger MM, Deutz NEP, et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition: intensive care. Clin Nutr. 2006;25(2)210-223. DOI: 10.1016/j.clnu.2006.01.021.

16- Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books, 1988.

17- Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgdon JA, Van Itallie TB. Lean body mass stimulation by biolectrial impedance analysis: a four-site cross-validation study. Am J Clin Nutr 1988;47(1):7-14.

18- Fidalgo TKS, Freitas-Fernandes LB, Angeli R, et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lessions. Metabolomics. 2012;9(3):657-666. DOI: 10.1007/s11306-012-0484-7.

19- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat Protoc. 2007;2(11):2692-2703. DOI: 10.1038/nprot.2007.376.

20- Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: The Human Metabolome Database. Nucleic Acids Research, v. 35, p. D521-D526, 2007. DOI: 10.1093/nar/qkl923.

21- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, *et al*. MetaboAnalyst 3.0–making metabolomics more meaningful. Nucleic Acids Res. 2015;43 (W1):W251-257.

22- de Gregoris TB, Aldred N, Clare AS, *et al*. Improvement of phylim- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. J Microbiol Methods. 2011;86:351-356.

23- Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, *et al*. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. BMC Genomics. 2013;14:788.

24- Trumbo P, Schicker S, Yates AA, et al. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. J Am Diet Assoc. 2002;102(11):1621-1630.

25- Sze MA, Schloss PD. Looking for a signal in the noise: revisiting obesity and the microbiome. MBio. 2016;7(4):e01018-16. DOI: 10.1128/mBio.01018-16.

26- She P, Horn CV, Reid T, et al. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. Am J Physicol Endocrinol Metab. 2007;293:E1552-E1563.

27- Karusheva Y, Koessler T, Strassburger K, et al. Short-term dietary reduction of branched-chain amino acids reduces meal-induced insulin secretion and modifies microbiome composition in type 2 diabtes: a randomized controlled crossover trial. AM J Clin Nutr. 2019;110(5):1098-1107.

28- Ma Q, ZHou X, Hu L, Chen J, Zhu J Shan A. Leucine and isoleucine have similar effects on reducing lipid accumulation, improving insulin sensitivity and increasing the browning of WAT in high-fat diet-induced obese mice. Food Funct. 2020;DOI: 10.1039/c9fo03084k

29- Blanc MC, Moinard C, Béziel A, Darquy S, Cynober L, De Bandt JP. Arginine and glutamine availability and macrophage functions in the obese insulin-resistant Zucker rat. J Cell Physiol. 2005 Jan;202(1):153-9
30- De Souza AZ, Zambom AZ, Abboud KY, et al. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. Nutrition. 2015;31(6):884-889.
31- Niu YC, Feng RN, Hou Y, et al. Histidine and arginine are associated with inflammation and oxidative stress in obese women. Br J Nutr. 2012;108(1):57-61.
32- Pekkala S, Munukka E, Kong L, et al. Toll-like receptor 5 in obesity: the role of gut microbiota and adipose tissue inflammation. Obesity (Silver Spring). 2015; 23(3):581-590.
33- Chiadak JD, Gena P, Gregoire F, et al. Lipopolysaccharide modified glycerol permeability and metabolism in 3T3-L1 adipocytes. Int J Mol Sci. 2017;18(12):E2566.
34- Pérez de Heredia F, Wood IS, Trayhurn P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. Pflugers Arch. 2010;459(3):509-518.
35- Prinen E, Kuulasmaa T, Pietilä M, et al. Enhanced polymine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. Mol Cell Biol. 2007;27(13):4953-4967.
36- Delzenne NM, Kok N, Deloyer P, et al. Dietary fructans modulate polyamine concentration in the cecum of rats. J Nutr. 2000;130(10):2456-2460.
37- Sadasivan SK, Vasamsetti B, Singh J, et al. Exogenous administration of spermine improves glucose utilization and decreases bodyweight in mice. Eur J Pharmacol. 2014;729:94-99.

Table 1. Characterization of population and comparison of anthropometric, biochemistry, and dietary intake variables in baseline and variation between groups

Variables	Time	PG (n=10)	SG (n=11)	CG (n=11)	*p*-value
Age (years)		34.70±8.99	35.18±5.58	31.45±6.19	0.41
Weight (kg)	Baseline	87.67±10.39	93.00±8.58	88.72±14.24	0.52
	Δ	-0.58±2.19	-2.24±2.11	-1.35±2.05	0.22
BMI (kg/m^2)	Baseline	33.51±2.44	36.34±10.08	33.78±3.07	**0.03**[1]
	Δ	-0.25±0.86	-0.87±0.85	-0.54±0.75	0.23
WC (cm)	Baseline	99.28±6.11	98.42±9.00	94.54±10.74	0.43
	Δ	-0.73±2.27	-1.80±1.96	-1.83±4.38	0.66
FFM (kg)	Baseline	48.39±5.13	50.45±4.26	48.55±5.30	0.69
	Δ	0.16±0.76	-0.62±0.91	-0.44±0.86	0.11
BFM (%)	Baseline	44.72±2.01	45.71±1.33	43.69±2.21	0.06
	Δ	-0.58±0.85	-0.66±0.60	-0.43±0.69	0.73
Energy (Kcal)	Baseline	1600.72±408.59	1502.92±567.20	1791.88±613.35	0.11
	Δ	-221.67±494.83	-233.39±625.50	-297.07±579.86	0.85
Protein (g/kg of body weight)	Baseline	0.73±0.24	0.73±0.32	0.92±0.42	0.06
	Δ	0.01±0.39	0.03±0.42	0.02±0.53	0.99
Fat (%)	Baseline	31.09±8.04	31.13±10.81	27.93±6.46	0.24
	Δ	-3.20±9.96	-3.95±1.22	-0.49±9.72	0.39
Carbohydrate (%)	Baseline	51.61±9.26	50.50±12.98	52.39±11.06	0.79
	Δ	0.70±13.71	0.65±14.86	-2.12±12.91	0.65
Fiber (g)	Baseline	15.39±7.90	15.09±9.57	20.92±9.45	**0.02**[3]
	Δ	0.89±9.45	-0.49±9.97	-2.93±10.06	0.30

Legend: PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG: control group; BMI: body mass index; WC: waist circumference; FFM: fat free mass; BFM: body fat mass; Δ: delta (final value-baseline value); [1]G1 x G2, [2]G1 x G3, [3]G2 x G3.

Comparison between groups was evaluated by ANOVA one-way.

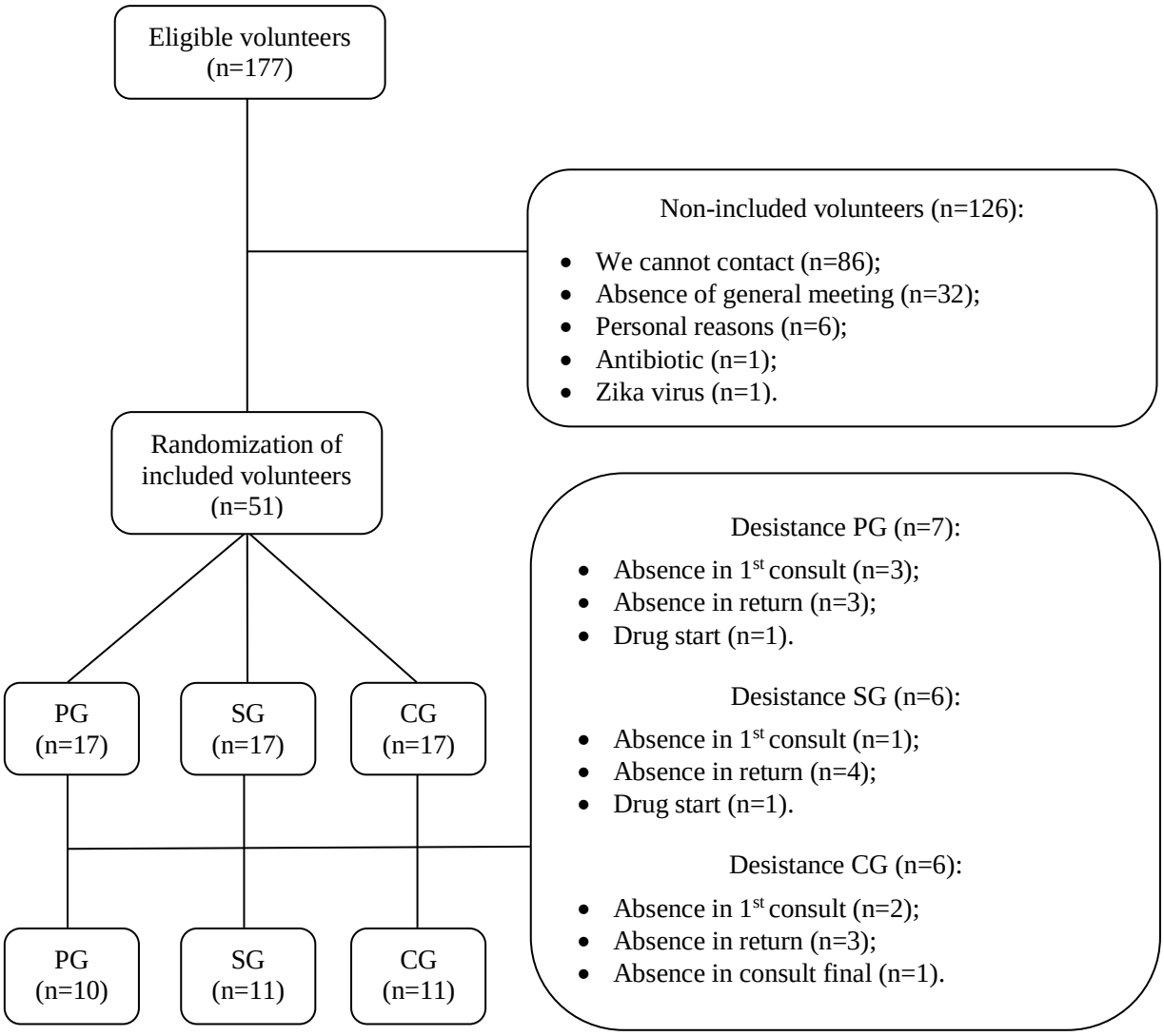


Figure 1. Flowchart of volunteers of research control group

Legend: BMI: body mass index; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro; PG: probiotic group; SG: symbiotic group; CG:

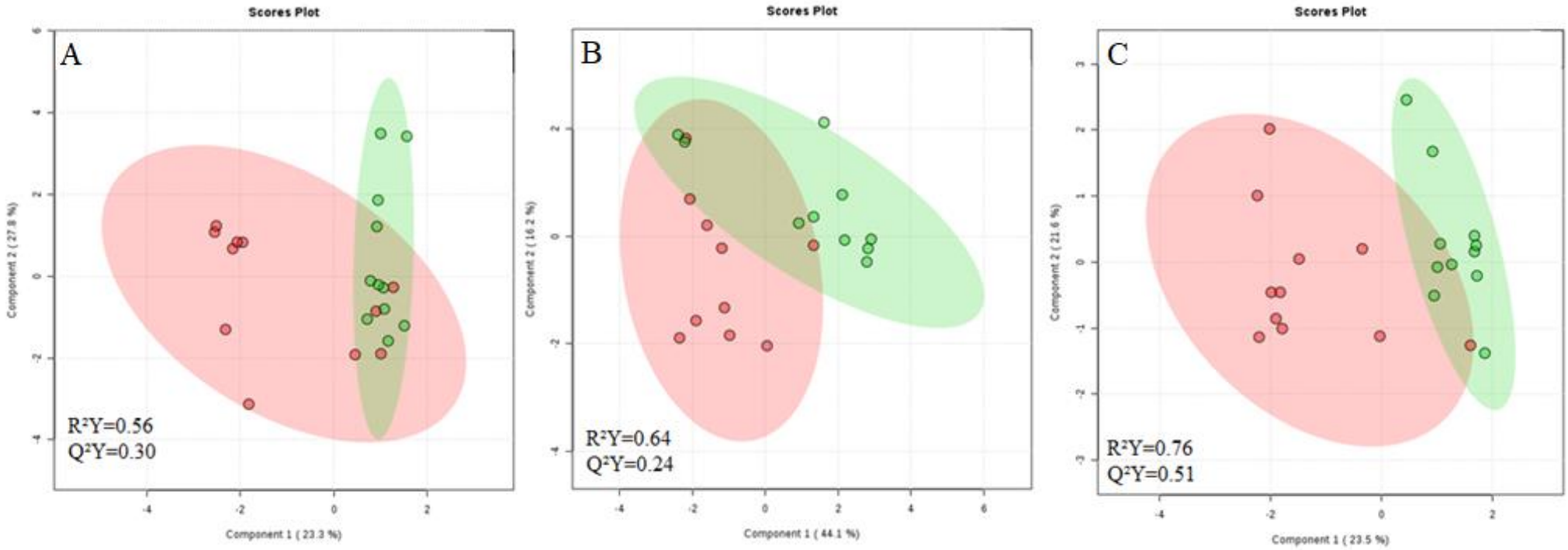


Figure 2. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) of metabolic profile before and after 60 days of interventionwith probiotics, symbiotics or placebo.

Legend: ● baseline; ● final; A) PG:probiotic group; B) SG: symbiotic group; C) CG: control group.

Analysis performed in all participants

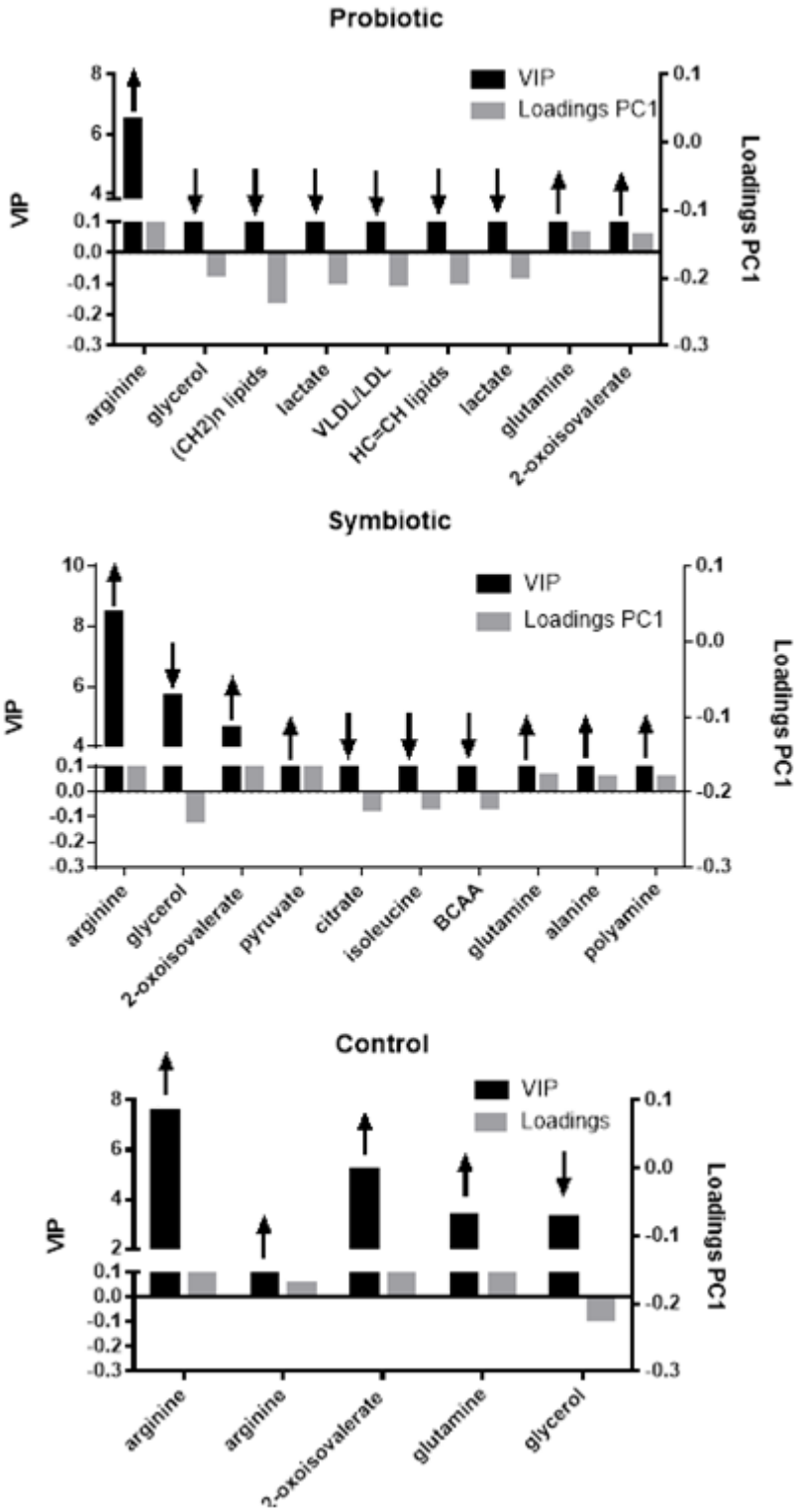


Figure 3. Discriminat metabolites after 8 weeks of intervention in women with obesity.

Variables important for projection (VIP) and PLS-regression coefficient (loadings) for Principal component 1 are shown for specific metabolites with VIP scores higher than 0.2, according to PLS-DA analysis performed in Metaboanalyst.

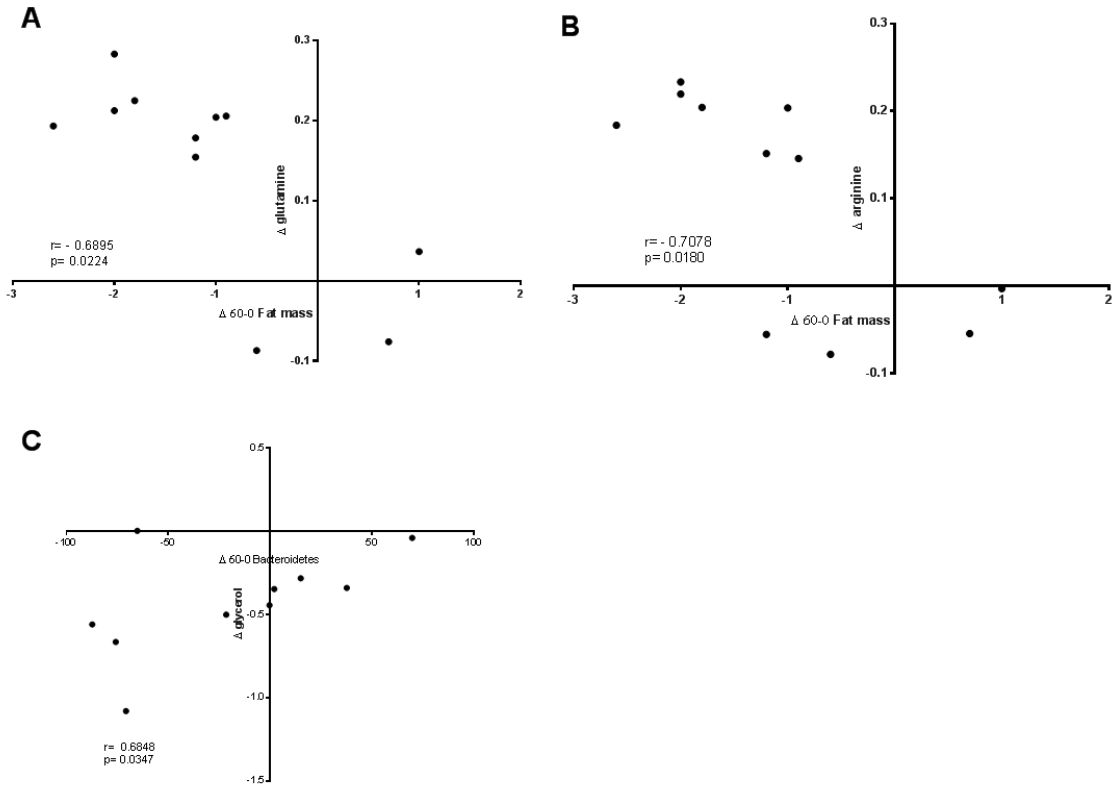


Figure 4. Spearman correlation analyses between changes in Fat mass and *Bacteroidetes* and metabolites after 8 weeks of intervention in the Symbiotic group.

Metabolites' changes (Δ: W8-W0) were calculated according to the normalization performed in the dataset using Metaboanalyst software, and significant negative correlations for changes in fat mass and glutamine (A) and arginine (B) and positive correlation between changes in *Bacteroidetes* and glycerol (C) are shown.

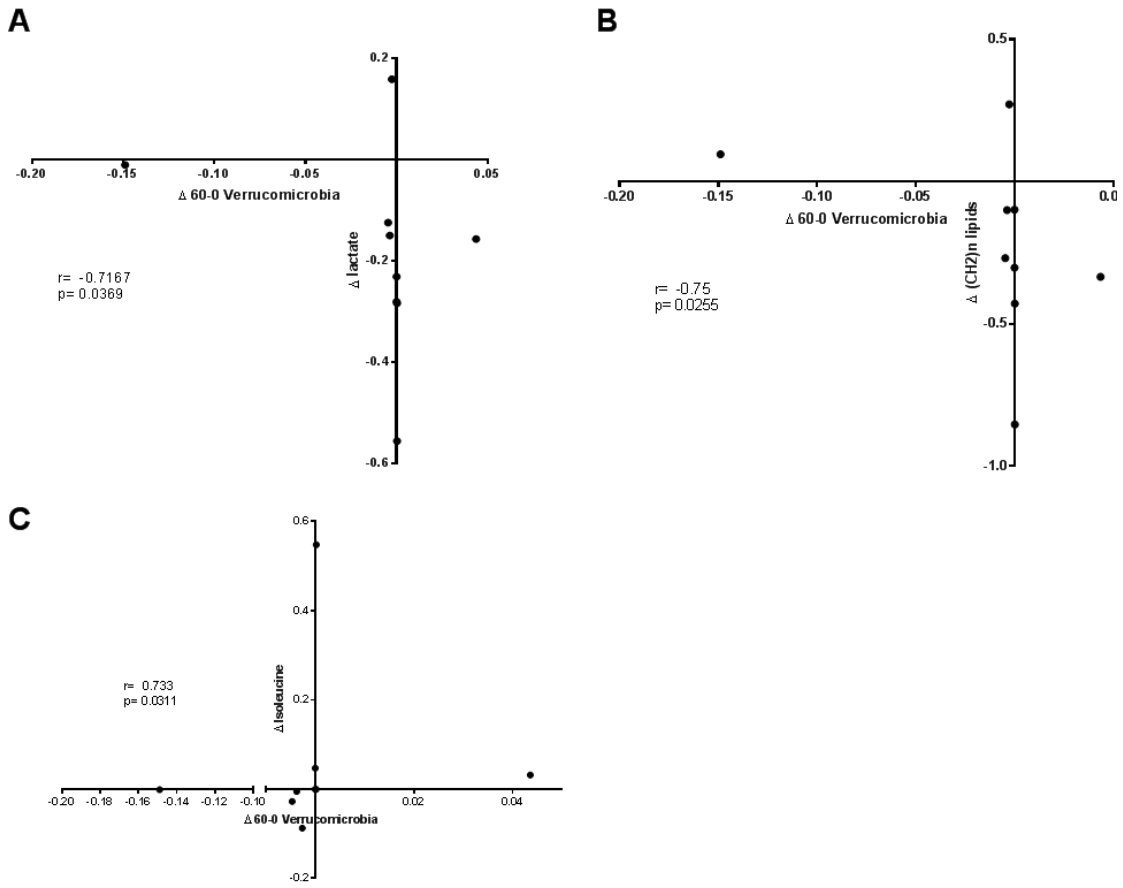


Figure 5. Spearman correlation analyses between changes in *Verrucomicrobia* and metabolites after 8 weeks of intervention in the Probiotic group.

Metabolites' changes (Δ: W8-W0) were calculated according to the normalization performed in the dataset using Metaboanalyst software, and significant negative correlations for changes in *Verrucomicrobia* and lactate (A) and $(CH_2)_n$ lipids (B) and positive correlation for changes in *Verrucomicrobia* and isoleucine (C) are shown.

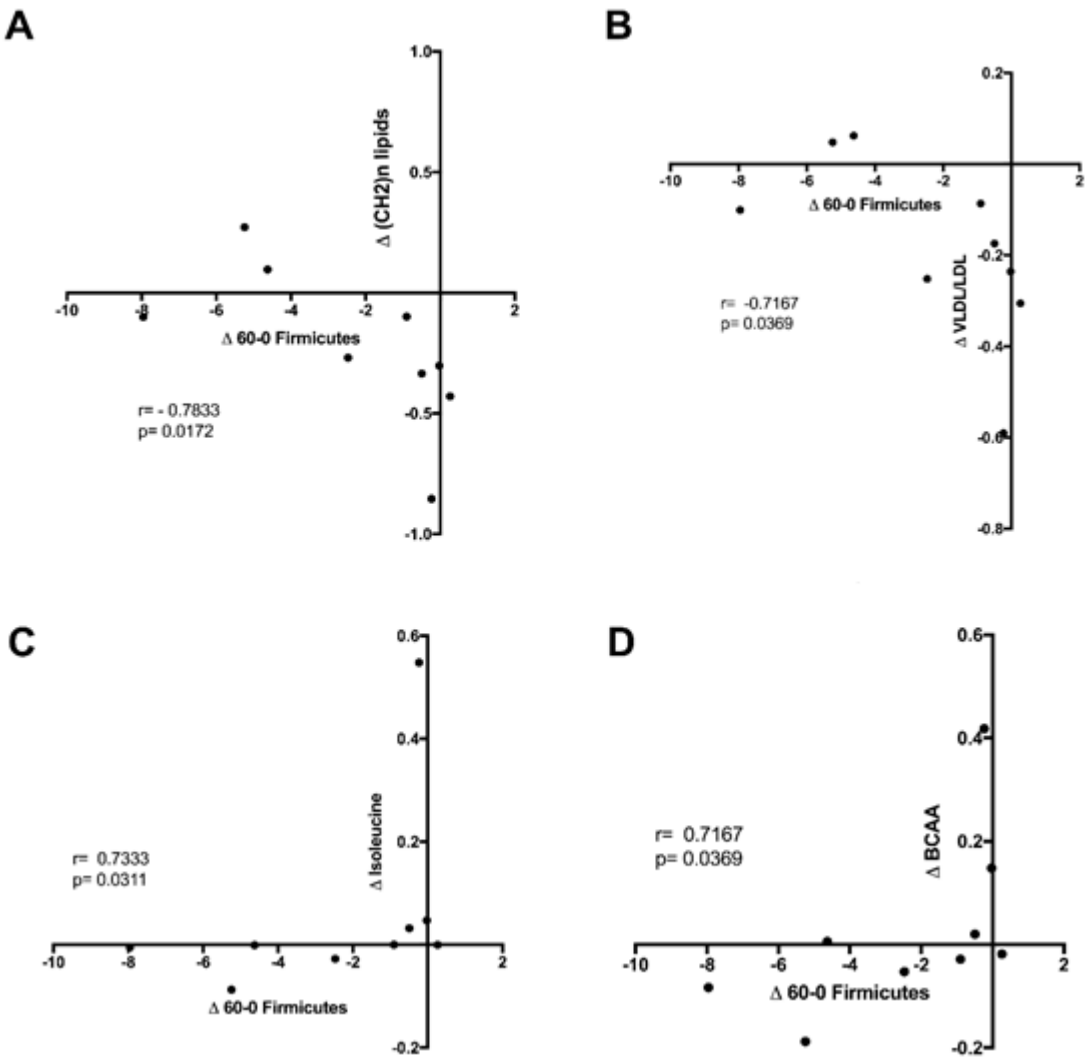


Figure 6. Spearman correlation analyses between changes in *Firmicutes* and metabolites after 60 days of intervention in the probiotic group.

Metabolites' changes (Δ: W8-W0) were calculated according to the normalization performed in the dataset using Metaboanalyst software, and significant negative correlations for changes in *Firmicutes* and (CH2)n lipids (A) and VLDL/LDL (B) and positive correlations for changes in *Firmicutes* and isoleucine (C) and BCAA (D) are shown.

Supplementary material

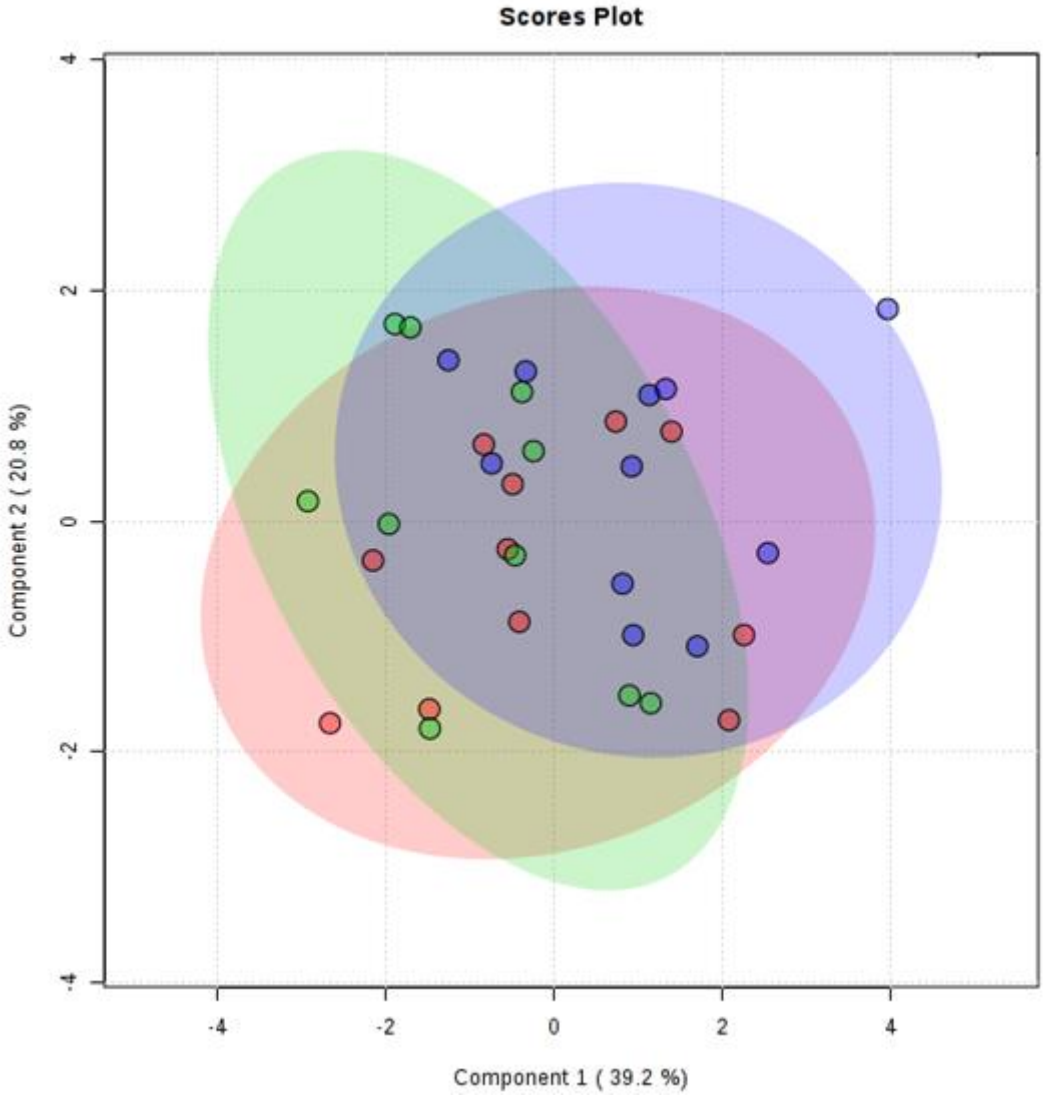


Figure 1. Comparison of Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) in metabolites between groups in baseline.

Legend: ● CG (control group); ● PG (probiotic group), ● SG (symbiotic group).

7. Considerações finais

Com os crescentes estudos para compreender o papel que a microbiota intestinal exerce no processo do desenvolvimento da obesidade, se faz importante estudar a modulação da microbiota como uma forma terapêutica para doença.

No presente trabalho observamos que mulheres com obesidade submetidas à intervenção com probiótico *B. lactis* durante 60 dias tiveram redução de triglicerídeos. Apesar de não terem apresentado alteração na composição da microbiota intestinal, foi observada uma redução em metabólitos associados aos lipídios.

Por outro lado, o uso do simbiótico (combinação de *B. lactis* com FOS) levou à perda de peso corporal discreta e aumento de *Verrucomicrobia*, filo associado a eutrofia e saúde. Esta alteração na microbiota se mantém apenas mediante uso do simbiótico, após suspensão houve redução neste filo. Ademais, este grupo teve maior alterações nos metabólitos, mostrando uma melhora na inflamação e do metabolismo do TA.

Apesar das limitações que o estudo apresenta, os dados encontrados podem contribuir com o entendimento dos efeitos da modulação da microbiota intestinal por meio deprobiótico e simbiótico em mulheres com obesidade graus 1 e 2 na perda de peso corporal, melhora de variáveis laboratoriais associadas ao controle glicêmico e perfil lipídico, além de verificar o impacto sobre o metabolismo.

Estudos com número amostral maior e por mais tempo são importantes a fim de desvendar o papel que a modulação da microbiota exerce sobre o metabolismo do hospedeiro e, por conseguinte, os efeitos benéficos ocasionados nas variáveis antropométricas e laboratoriais analisadas em indivíduos com excesso de peso corporal.

8. Referências bibliográficas

ADAMS, S. H. Emerging perspective on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 6, p. 445-456, Nov. 2011.

AL-LAHHAM, S. H. et al. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n. 11, p. 1175-1183, Nov. 2010.

ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 91-109, Jan. 2012.

AGIN A. et al. Metabolomics –an overview. From basic principles to potential biomarkers. **Médecine Nucléaire**, v. 40, n. 1, p. 4-10, Feb. 2016.

ARAÚJO, J. R. et al. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. **Biochimie**, v. 141, p. 97-106, Oct. 2017.

ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, May. 2011.

ASEMI, Z. et al. Effects of synbiotic food consumption on metabolic status of diabetic patients: a double-blind ranzomized cross-over controlled clinical trial. **Clincal Nutririon**, v, 33, n, 2, p, 198-203, Apr. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO**. 4ª ed. São Paulo, SP, p. 186, 2016.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regales fat storage. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 204, n. 44, p. 15718-15723, Nov, 2004.

BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915-1920, Mar. 2005.

BÄCKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 979-984, Jan. 2007.

BÄCKHED, F. et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host& Microbe**, v. 17, n. 5, p. 690-703, May. 2015.

BAGHERI, M. et al. Plasma metabolomic profiling of amino acids and polar lipids in Iranian obese adults. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, p. 94, Apr. 2019.

BAYS, H. E. et al. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 6, n. 3, p. 391-409, Mar. 2008.

BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocol**, v. 2, n. 11, p. 2692-2703, Feb. 2007.

BENSON, A. K. et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 107, n. 44, p. 18933-18938, Nov. 2010.

BERNINI, J. et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 716-719, Jun. 2016.

BLANC, M. C. et al. Arginine and glutamine availability and macrophage functions in the obese insulin-resistant Zucker rat. **Journal of Cellular Physiology**. V. 202, n. 1, p. 153-159, Jan. 2005.

BLEKMAN, R. et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. **Genome Biology**, v. 16, p. 191, Sep. 2015.

BOMHOF, M. R. et al. Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis*on gut microbiota and glycemia in obese rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 3, p. 763-771, Mar. 2014.

BORGERAAS, H. et al. Effects of probiotics on body weight, body mas index, fatmass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **ObesRev**, v. 19, n. 2, p. 219-232, Feb. 2018.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, 9 jan. 2002. Disponivél em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em 18 abril de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério de Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS E PROMOÇÃO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2016: Vigilância de fatores e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: Estimativas sobre freqüência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016** / 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, 160 p., 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS E PROMOÇÃO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: Estimativas sobre freqüência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018** / 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, 131 p., 2019.

BRAY, G. A. et al. The science of obesity management: an endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 2, p. 79-132, Apr. 2018.

BRENNAN, L. NMR-based metabolomics: from sample preparation to applications in nutrition research. **Progress in Nuclear Magnetic ResonanceSpectroscy**, v. 83, n. 42-49, Nov. 2014.

CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544-551, Sep. 2012.

CALVANI, R et al. Aplication of NMR-based metabolomics to the study of gut microbiota in obesity. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, suppl. 1, p. S5-7, Nov.-Dec. 2014.

CAMARGO, E. B.; BOTELHO, R. A. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005.

CÂNDIDO, F. G. et al. Impacto f dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 125-143, Mar. 2018.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.6, n.7, p.1761-1772, Jul. 2007.

CANI, P. D. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, suppl. 4, p. 50-53, Nov. 2012.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: definição, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, Jan. 2018.

CARRERAS, N. L. et al. Anti-obesity properties of the strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CECT8145 in Zücker fatty rats. **Beneficial Microbes**, v. 15, n. 4, p. 629-641, Jun. 2018.

CARVALHO, B. M.; SAAD, M. J. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 986734, Jun. 2013.

CASTANER, O. et al. The gut microbiome profile in obesity: a systematic review. **International Journal of Endocrinology**, v. 2018, p. 4095789, Mar. 2018.

CHA, Y. S. Effects of L-carnitine on obesity, diabetes, and as an ergogenic aid. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, Suppl. 1, p. 306-308, 2008.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 110-119, Nov 2015.

CHIADAK, J. D. et al. Lipopolysaccharide modified glycerol permeability and metabolism in 3T3-L1 adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. E2566, Nov. 2017.

CHO, Y. A.; KIM, J. Effect of probiotics on blood lipid concentrations: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 43, p. e1714, Oct. 2015.

CHOI, J.; HUR, T. Y.; HONG, Y. Influence of altered gut microbiota composition on aging and aging-related diseases. **Journal of Lifestyle Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-7, Jan. 2018.

CIRULLI, E. T. et al. Profound perturbation of the metabolome in obese is associated with health risk. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 488-500, Feb. 2019.

CLAESSON, M. J. et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6669, Aug. 2009.

CLEMENTE-POSTIGO, M. et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidy obese patients. **Journal of Lipids Ressarch**, v. 53, n. 5, p. 97973-978, May. 2012.

COUTINHO, W. C. Consenso Latinoamericano de Obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 1, p. 21-67, Feb. 1999.

CROVESY, L. et al. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. **International Journal of Obesity (Lond)**, v. 41, n. 11, p. 1607-1614, Jul. 2017.

CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, DOI: 10.1038/s41430-020-0607-6, Mar. 2020.

DAVENPORT, R. R. Elucidating the role of the host genome in shoping microbiome composition. **Gut Microbes**, v. 7, n. 2, p.178-184, 2016.

DELZENNE, N. M. et al. Dietary fructans modulate polyamine concentration in the cecum of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n.10, p. 2456-2460, Oct. 2000.

DEFINA, L. F. et al. Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 455-462, Feb. 2011.

DE LA CUESTA-ZULUAGA, J. et al. Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiois, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factores. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 51, Jan. 2019.

DESAI, M. S. et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339-1353, Nov. 2016.

DE SOUZA, A. Z. et al. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. **Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 884-889, Jun. 2015.

DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial Pathogenis**, v. 106, p. 171-181, May. 2017.

DOGRA, S. et al. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational durantion and are associated with subsequent adiposity. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02419-14, Feb. 2015.

DONG, J. Y. et al. Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 7, p. 1188-1194, Jul. 2013.

DUEÑAS, M.; et al. Studies on modulation gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omics approaches. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 1-21. Jan. 2015.

DUNN, W. B. et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387-426, Jan. 2011.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, Jun. 2005.

EVERARD, A.; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.27, n.1, p.73-83, Feb. 2013.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v. 110, n. 22, p. 9066-9071, May. 2013.

EDWARDS, C. A. Determinants and duration of impact of early gut bacterial colonization. **Ann NutrMetab**, v. 70, n. 3, p. 246-250, Mar. 2017.

ESLAMPARAST, T. et al. Effects of symbiotic supplementation on insulin resistance in subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 3, p. 438-445, Aug. 2014.

FAVA, F. et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. **International Journal of Obesity (Lond)**, v. 37, p. 216-223, Mar. 2013.

FIDALGO, T. K. S. et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lessions. **Metabolomics**, v. 9, n. 3, p. 657-666, Dec. 2012.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 499-502, Jun. 1972.

FROST, G. et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic. **Nature Communications**, v. 5, p. 3611, Apr. 2014.

GAO, Z. et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1509-1517, Jul. 2009.

GEURTS, L. et al. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: a novel insight into molecular targets and interventions using prebiotics. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 1, p.3-17, Mar. 2014.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 391-395, Feb. 2000.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, Aug. 2017.

GRAY, D. S. et al. Effect of obesity on bioelectrical impedance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, n. 2, p. 255-260, Ago. 1989.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p.13-27, Jun. 2017.

GOODACRE, R. et al. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 254-252, May. 2004.

GOODRICH, J. K. et al. Human genetics shape the gut micobiome. **Cell**, v. 154, n. 4, p. 789-799, Nov. 2014.

GREGORIS, T. B. et al. Improvement of phylim- and class-specific promers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351-356, Sep. 2011.

GUARNER, F. et al. **Diretrizes mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia - Probiótico e prebiótico**. p. 29, Oct. 2011.

GUEDES, E. P. et al. Obesidade: etiologia. **Projetos Diretrizes**, 2005. Disponível em: <https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/obesidade-etiologia.pdf>. Acessoem 17 de abrilde 2019.

GUYNNET, D. et al. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and digestive symptons in women reporting minor digestive symptoms: a randomized, double-blind, parallel, controlled study. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 11, p. 1654-1662, Dec. 2009.

GUH, D. P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**. v. 9, p. 88, Mar. 2009.

HADI, A. et al. Efficacy of symbiotic supplementation in obesity treatment: a systematic review and meta-analyziz of clinical trials. **Critical Reviewa in Food Science and Nutrition**, v. 30, p. 1-13, Dec. 2018.

HAMAD, E. M. et al. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 716-724, Mar. 2009.

HARO, C. et al. Consumption of two dietary patterns restored microbiota dysbiosis in obese patients with metabolic dysfunction. **Molecular Nutrition e Foods Research**, v. 61, n. 12, DOI: 10.1002/mnfr.201700300, Dec. 2017.

HE, Q. et al. Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR based metabonomic approach. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 133–139, Feb. 2012.

HE, J.; ZHANG, F.; HAN, Y. Effect of probiotic on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes. **Medicine**, v. 96, n. 51, p. e9166, Dec. 2017.

HEATON, K. W. et al. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. **Gut**, v. 33, n. 6, p. 818-824, Jun. 1992.

HERMANN-BANK M. L. et al. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. **BMC Genomics**, v. 14, p. 788, Nov. 2013.

HERNÁNDEZ, M. A. G. et al. The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. E1943, Aug. 2019.

HIBBERD, A. A. et al. Probiotic or symbiotic alters the gut microbiota and metabolism in a randomized controlled trial of weight management overweight adults. **Beneficial Microbes**, v. 10, n. 2, p. 121-135, Mar. 2019.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, DOI: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016, Jun. 2016.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716-1724, Aug. 2009.

HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual Review Nutrition**, v. 22, p. 283-307, Apr. 2002.

HOU, X. et al. Impacto f waist circumference and body mass index on risk of cardiometabolic disorder and cardiovascular disease in Chinese adults: a national diabetes and metabolic disorders survey. **PLos One**, v. 8, n. 3, p. e57319, Mar. 2013.

IBRAHIM, M.; ANISHETTY, S. A meta-metabolome network of carbohydrate metabolism: interactions between gut microbiota and host. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 428, n. 2, p. 278-284, Nov. 2012.

ISMAIL, A. N. et al. Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**, v. 7, n. 3, p. 501-507, Jun. 2011.

IVEY, K. L. et al. The effects of probiotic bacteria on glycaemic control in overweight men and women: a randomised controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 447-452, Apr. 2014.

IVEY, K. L. et al. The effect of yogurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid rofile; a randomised controlled trial. **Nutrition, Metabolism and Carbiovascular Disease**, v. 25, n. 1, p. 46-51, Jan. 2015.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, Aug. 2015.

JOHN, G. K. et al. Dietary alteration of the gut microbiome and its impact on weight and fat mass: a systematic review and meta-analysis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. e167, Mar. 2018.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, Apr. 2014.

KALIANNAN, K. et al. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. **Scientific Report**, v. 5, p. 11276, Jun. 2015.

KASAI, C. et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japonese population, as analyzed by terminal restriction fragment lengh polymorphism and mext-generation sequencing. **BMC Gastroenterology**, v. 15, p. 100, Aug. 2015.

KARUSHEVA, Y. et al. Short-term dietary reduction of branched-chain amino acids reduces meal-induced insulin secretion and modifies microbiome composition in type 2 diabetes: a randomized controlled crossover trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 5, p. 1098-1107, Nov. 2019.

KASSAIAN, N. et al. The effects of probiotics and symbiotic supplementation on glucose and insulin metabolism in adults with prediabetes: a double-blind randomized clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 55, n. 10, p. 1019-1028, Oct. 2018.

KEMSLEY, E. K. et al. Multivariate techniques and their application in nutrition: a metabolomics case study. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 1-14, Jul. 2007.

KHALESI, S. et al. Effect of probiotic on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **Hypertension**, v. 64, p. 897-903, Jul. 2014.

KLOP, B.; ELTE, J. W.; CABEZAS, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v. 5, n .4, p. 1218-1240, Apr. 2013.

KREYMANN, K. G. et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition: intensive care. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 210-223, Apr. 2006.

KOBYLIAK. N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 43, Apr. 2016.

KOCELAK, P. et al. Resting energy expenditure and gut microbiota in obese and normal weight subjects. **Europeam Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 20, p. 2816-2821, Oct. 2013.

KOH, A. et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, Jun. 2016.

KOLEVA, P. T.; BRIDGMAN, S. L.; KOZYRSKYJ, A. L. The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p.2237-2260, Mar. 2015.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotic in health and disease. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

KOLIDA, A. et al. Associaton between body mass index and *Firmicutes*/*Bcateroidetes*ratio in an adult Ukranian population. **BMC Microbiology**, n. 17, p. 120, 2017.

KOSTNER, G. M. et al. Determination of high-density lipoproteins: screening methods compared. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 939-942, Jun. 1979.

KRUMAR, M. et al. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. **Nutrition and Healthy Aging**, v. 4, n.1, p. 3-16, Oct. 2016.

LACKEY, D. E. et al. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 11, p. E1175-1187, Jun. 2013.

LAMBERT, D. M.; MUCCIOLI, G. G. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new

molecular players. **Current Opinion Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n.6, p. 735-744, Nov. 2007.

LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 2, p. 208-222, Feb. 2013.

LEE, S. A. et al. Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequensing. **Nutrition Research and Practice**, v. 9, n. 3, p. 242-248, jun. 2015.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11070-11075, Aug. 2005.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, Dec. 2006.

LI, X.; SHIMIZU, Y.; KIMURA, I. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 36, n. 4, p. 135-140, Aug. 2017.

LIMA, A. B. Avaliação do nível de atividade física de uma pequena população adulta do município do Rio de Janeiro por meio do IPAQ (Questionário Internacional de Atividade Física) versão curta. **Revista Digital**, v. 16, n. 162, nov. 2011. Disponível em: <http://www.efdeportes.com/>. Acesso em 20 de abril de 2019.

LIN, H. V. et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35240, Apr. 2012.

LIU, R. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 859-868, Jul. 2017.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human Kinetics Books, 1988.

LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1754-1760, Nov. 1975.

LOUIS, S. et al. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149564, Feb. 2016.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-230, Sep. 2012.

LUKASKI, H. C. et al. Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 810-817, Apr. 1985.

LUDWIG, C.; GÜNTHER, U. L. MetaboLab—advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 366, Sep. 2011.

MA, N. et al. Contributions of the interaction between dietary protein and gut microbiota to intestinal health. **Current Protein &Peptide Science**, v. 18, n. 8, p. 795-808, Feb. 2017.

MA, Q. et al. Leucine and isoleucine have similar effects on reducing lipid accumulation, improving insulin sensitivity and increasing the browning of WAT in high-fat diet-induced obese mice. **Food & Functional**, DOI: 10.1039/c9fo03084k, Feb. 2020.

MADSEN, L. et al. Links between dietary protein sources, the gut microbiota, and obesity. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1047, Dec. 2017.

MALACHIAS, M. V. B. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 7ª Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3(supl.3), p. 1-51, Set. 2016.

GUAZZELLI MARQUES, C. et al. Weight loss probiotic supplementation effect in overweight amd obesity subjevts: a review. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 694-70, Mar. 2020.

MATSUDO, S. et al. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validação e reprodutibilidade no Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2001.

MATSUMOTO, M. et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. **Scientific Report**, v. 2, p. 233, Jan. 2012.

MATTHEWS, D. R.; et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, Jul. 1985.

MAYENGBAM, S. et al. Impact of dietary fiber supplementation on moduling microbiota-host-metabolic axes in obesity. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 64, p. 228-236, Feb. 2019.

MCARDLE, M. A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers of Endocrinology (Lausanne)**, v. 4, p. 52, May. 2013.

MCGOWAN, M. W. et al. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 538-542, Mar. 1983.

MECHANICK, J. I. et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient – 2013 update: cosponsored by American Association of clinical endocrinologists, the obesity society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 0-1, p. S1-27, Mar. 2013.

MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri*and depleted in *Bifidobacterium animalis*and *Methanobrevibacter smithii*. **International Journal of Obesity (London),** v. 36, n. 6, p. 817-825, Jun. 2012a.

MILLION, M. et al. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**, v.53, n.2, p.100-108, Aug. 2012b.

MILLION, M. et al. Correlation between body mas índex and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Echerichia coli*. **International Journal of Obesity (London)**, v. 37, n. 11, p. 1460-1466, Nov. 2013.

MORAN, C. P.; SHANAHAN, F. Gut microbiota and obesity: role in aetiology and potential therapeutic tardet. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.28, n. 4, p. 585-597, Aug. 2014.

MORRIS, C. et al. The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. **TheProceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 634-638, Nov. 2012.

MOROTI, C. et al. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p.1-8, Feb. 2012.

MUCCIOLI, G. G. et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Molecular Systems Biology**, v. 6, p. 392, Jul. 2010.

DE MUINCK, E. J.; TROSVIK, P. Individuality and convergence of the infant gut microbiota during the first year of life. **Nature Communications**, n. 9, v. 1, p. 2233, Jun. 2018.

MUSCOGIURI, G. et al. Gut microbiota: a new path to treat obesity. **International Journal of Obesity**, v. 9, n. 1, p. 10-19, Apr. 2019.

NEHRA, V. et al. Gut microbiota: modulation of host physiology in obesity. **Physiology**, v. 31, n. 5, p. 327-335, Sep. 2016.

NG, M. 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. **Lancet**. v. 384, n. 9945, p. 766-781. Aug. 2014.

NICHOLSON, J.K. et al. The challenges of modeling mammalian biocomplexity. **Nature Biotechnology**, v. 22, n.10, p.1268-1274, Oct. 2004.

NIU, Y. C. et al. Histidine and arginine are associated with inflammation and oxidative stress in obese women. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 1, p. 57-61, Jul. 2012.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO (NEPA) / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP). **Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO).** 4. ed. revisada e ampliada, Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2011. 161p.

OELLGAARD, J. et al. Trimethylamine N-oxide (TMAO) as a new potential therapeutic target for insulin resistance and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 25, p. 3699-3712, Jun. 2017.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos.** 8ª ed. (revista e ampliada), p. 54. São Paulo: Atheneu, 2007.

OTTOSSON, F. et al. Connection between BMI related plasma metabolite profile and gut microbiota. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 4, p. 1491-1502, Apr. 2018.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, Jul. 2015.

PANWAR, H. et al. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes – prospects and perspectives. **Diabetes Metabolism Researchand Reviews**, v.29, n.2, p.103-112, Feb. 2013.

PARK, S.; BAE, J. H. Probiotic for weight loss: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Research**, v. 35, n. 7, p. 566-575, Jul. 2015.

PASCALE, A. et al. Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, v. 61, n. 3, p. 357-371, May. 2018.

PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **Journal of Obesity**, v. 2013, p. 616193, Mar. 2013.

PEKKALA, S. et al. Toll-like receptor 5 in obesity: the role of gut microbiota and adipose tissue inflammation. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 3, p. 581-590, Mar. 2015.

PEÑA, F. et al. Effect of the synbiotic (*B. animalis*spp. *lactis* Bb12 + Oligofructose) in obese subjects. A randomized, double-blind, controlled clinical trial. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 8, 491-498, Aug. 2014.

PÉREZ DE HEREDIA, F.; WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. **Pflugers Archiv: Europe Journal of Physiology**, v. 459, n. 3, p. 509-518, Feb. 2010.

PÉREZ-ENCISO, M.; TENENHAUS, M. Prediction of clinical outcomes with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. **Human Genetics**, v. 112, n. 5-6, p. 581-592, May. 2003.

PINTÉR, Z. et al. Reliability of anthropometric parameters in the prediction of the visceral fat area among adult women. **Anthropologischer Anzeiger**, v. 70, n. 2, p. 147-64, 2013.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. 2ª ed. São Paulo: Coronário, 2002.

POTHURAJU, R.; SHARMA, R. K. Interplay of gut microbiota, probiotic in obesity: a review. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v. 18, n. 3, p. 212-220, Jan. 2018.

PRINEN E. et al. Enhanced polymine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 13, p. 4953-4967, Jul. 2007.

RABIEI, S.; SHAKERHOSSEINI, R.; SAADAT, N. The effects of symbiotic therapy on anthropometric measures, body composition and blood pressure in patient with metabolic syndrome: a triple blind RCT. **Medical Journal of Islamic Republic of Iran**, v. 29, p. 213, May. 2015.

RAGSDALE, S. W.; PIERCE, E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, n. 12p. 1873–1898, Dec. 2008.

RAUTAVA, S. et al. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. **Nature Reviews Garoenterology & Hepatology**, v. 9, n. 10, p. 565-576, Aug. 2012.

RERKSUPPAPHOL, S.; RERKSUPPAPHOL, L. A randomized double-blind controlled trial of *Lactobacillus acidophilus* plus *Bifidobacterium bifidum versus* placebo in patients

with hypercholesterolemia. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. KC01-4, Mar. 2015.

REZZI, S. et al. Nutritional metabonomics: applications and perspectives. **Journal of Proteome Resesearch**, v. 6, n. 2, p. 513-525, Feb. 2007.

RICHMOND, W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. And irs application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 1350-1356, Dec. 1973.

RINNINELLA, E. et al. What is the health gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, Jan. 2019.

RUTAYISIRE, E. et al. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. **BMC Gastroenterology**, n. 16, p.86, Jul. 2016.

SADASIVAN, S. K. et al. Exogenous administration of spermine improves glucose utilization and decreases bodyweight in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 729 p. 94-99, Apr. 2014.

SAMPAIO, L. **Avaliação nutricional**. Salvador: EDUFBA, 2012. 158 p.

SANTOS, R. D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, supl. 3, p. 1-40, Jan. 2013.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v.31, p. 107-133, 1997.

SAWICKI, C. M. et al. Dietary fiber and the human gut microbiota: application of evidence mapping methodology. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. E125, Fev. 2017.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 1, p. 190-195, Jan. 2010.

SECRETARIA DE PLANEJAMENTO DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estudo Nacional da Despesa Familiar – ENDEF**. Rio de Janeiro: IBGE, 1978.

SERVÁN, P.R. Obesity and diabetes. **Nutrución Hospitalaria**, v. 28, suppl. 5, p. 138-143, 2013

SEGAL, K.R. et al. Lean body mass stimulation by biolectrial impedance analysis: a four-site cross-validation study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 7-14, Jan. 1988.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, Aug. 2016.

SHE; P. et al. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. **American Journal of Physicoly. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1552-E1563, Dec. 2007.

SHI, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, Sep. 2015.

SMITH, J. D. et al. Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes: results from the INSPIRE ME IAA study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 5, p. 1517-25, May. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA (SBCBM). Diponível em: <https://www.sbcbm.org.br/>. Acesso em 10 de março 2019.

SUZUMURA, E. A., et al. Effects of oral supplementation with probiotics or synbiotics in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analyses of randomized trials. **Nutrition Reviews**, p. nuz001, Mar. 2019.

STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 333-339, Feb. 2005.

STENMAN, L. K et al. Probiotic with or without fiber controls body fat mass, associated with serum zonulin, in overweight and obese adults-randomized controlled trial. **EBio Medicine**, v. 13; p. 190-200, Nov. 2016.

SUN, L. et al. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. **Protein Cell**, v. 9, n. 5, p. 397-403, May 2018.

SWANN, J. R. et al. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, suppl. 1, p. 4523-4530, Mar. 2011.

SZE, M. A.; SCHLOSS, P. D. Looking for a signal in the noise: revisiting obesity and the microbiome. **MBio**, v. 7, n. 4, p. e01018-16, Jul.-Aug. 2016.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BOREN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832-44, Oct. 2007.

TAJABADI-EBRAHIMI, M. et al. A randomized controlled clinical trial investigating the effect of synbiotic administration on makerts of insulin metabolism and lipid profiles

in overweight type 2 diabetic patients with coronary heart disease. **Experimental Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 125, n. 1, p. 21-27, Jan. 2017.

TIRET, L. Gene-environment interaction: a central concept in multifatorial diseases. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 4, p. 457-463, Nov. 2002.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiologycal Review**, v. 81, n. 3, p. 1031-64, Jul. 2001.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-249, Sep. 2012.

TRUMBO, P. et al. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 11, p. 1621-1630, Nov. 2002.

TSUTSUI, H. et al. Biomarker discovery in biological specimens (plasma, hair, liver and kidney) of diabetic mice upon metabolite profiling using ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11-12, p. 861-872, May. 2011.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest energy. **Nature**, n. 444; v. 7122, p. 480-484, Dec. 2006.

TUN, H. M. et al. Roles of birth mode and infant gut microbiota in intergenerational transmission of overweight and obesity from mother to offspring. **JAMA Pediatrics**, v. 172, n. 4, p. 368-377, Apr. 2018.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Agricultural Research Service. National nutrient database for standard reference, release 20**. Nutrient Data Laboratory Home Page, 2007. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Acesso em 5 de abril de 2019.

VARELA-MOREIRAS, G. et al. Consensus documentand conclusions. Obesity and sedentarism in the 21st century: what can be done and what must be done? **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, Supl. 5, p. 1-12, 2013.

VERDU, E. F.; GALIPEAU, H. J.; JABRI, B. Novel player in celiac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 9, p. 497-506, Sep. 2015.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 3-14, Mar. 2007.

WALTERS, W. A.; XU, Z.; KNIGHT, R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. **FEBS Letters**, v. 588, n. 22, p. 4223-4233, Oct. 2014.

WANG, J. et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME Journal**, v.9, n.1, p.1-15, Jan. 2015.

WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal disbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2959-2977, Aug. 2017.

WISHART, D. S. et al. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D521-D526, Jan. 2007.

WONG, J. M. W. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gatroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235- 243, Mar. 2006.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia – Probioticos e prebióticos.** 2017. pp. 35.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Measuring obesity-classification and description of anthropometric data**. Report of a WHO Regional office Consultation on the Epidemiology of obesity. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office Europe, Nutrition Unit, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: WHO, 2000. p. 256. (WHO Obesity Technical Report Series, n. 284).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: WHO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact sheet: obesity and overweight**, n. 311, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em 18 de maio de 2019.

XAVIER, H. T. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz brasileira de dislipidemia e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-36 Out. 2013.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, p.14.10.1-14.10.91, Sep. 2016.

YOKOO, E. M. et al. Proposta metodológica para o módulo de consumo alimentar pessoal na pesquisa brasileira de orçamentos familiares. **Revista de Nutrição**, v.21, n.6, p.767-776, Nov./Dec. 2008.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass índex: a systematic review and metanalysis of randomized, controlled trials. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 571-580, Aug. 2015.

ANEXOS

ANEXO I

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
((HUCFF/ UFRJ))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da microbiota na perda de peso e no controle glicêmico de homens obesos com diabetes mellitus tipo 2

Pesquisador: Louise Crovesy de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31094014.0.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 744.555

Data da Relatoria: 31/07/2014

Apresentação do Projeto:

Protocolo 104-14. Respostas recebidas em 16.7.2014.

Constam os seguintes documentos: TCLE e Carta resposta ás Pendências.

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer n.707488 de 02.07.2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer n.707488 de 02.07.2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer n.707488 de 02.07.2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver parecer n.707488 de 02.07.2014.

Recomendações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1) De acordo com a Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa).

2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

RIO DE JANEIRO, 09 de Agosto de 2014

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
((HUCFF/ UFRJ))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da microbiota na perda de peso e no controle glicêmico de homens obesos com diabetes mellitus tipo 2

Pesquisador: Louise Crovesy de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31094014.0.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.038.757

Data da Relatoria: 09/04/2015

Apresentação do Projeto:

Protocolo 104-14. Emenda recebida em 27.3.2015.

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Solicita-se a substituição do termo "homens" por "mulheres" em todo o arquivo PB INFORMAÇÕES BASICAS 481131 E1.pdf, anexado em 23/3/2015.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora solicita a alteração do sexo dos voluntários que serão recrutados para o referido projeto de pesquisa. A alteração se deve ao fato de ter baixa procura de voluntários do sexo masculino interessados em participar do projeto, considerando o período de agosto de 2014, quando foi obtida a aprovação do projeto, até o presente mês (março de 2015). Ademais, foi realizada uma parceria com a Organização Não Governamental (ONG) Grupo de Resgate à Autoestima e Cidadania do Obeso (GRACO), local que possui grande número de mulheres com o perfil exigido para a pesquisa.

No projeto e demais documentos anexados, onde se lê homens passa a ser mulheres, onde se lê Sr. passa a ser Sra., onde se lê obeso passa a ser obesa; e onde se lê voluntário passa a ser voluntária. Além disso, foi acrescentado nos critérios de elegibilidade que não serão incluídas gestantes e lactantes.

Aproveito para solicitar a alteração do título do projeto de "Influência da microbiota na perda de peso e no controle glicêmico de homens obesos com diabetes mellitus tipo 2" para "Influência da microbiota na perda de peso e no controle glicêmico de mulheres obesas com diabetes mellitus tipo 2".

Análise: em conformidade.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS 466/2012, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos.
2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

ANEXO II

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

ClinicalTrials.gov Protocol and Results Registration System (PRS) Receipt
Release Date: 07/21/2015

Influence of Probiotic and Symbiotic in Body Weight, Blood Sugar and Lipemia of Obese Women

This study is currently recruiting participants.
Verified by Louise Crovesy de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, July 2015

Sponsor:	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Collaborators:	Rio de Janeiro State Research Supporting Foundation (FAPERJ)
Information provided by (Responsible Party):	Louise Crovesy de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT02505854

ANEXO III

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA

Nome:_____
Grupo:_____
Data: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: F ( ) M: ( )
Você trabalha de forma remunerada: ( ) Sim ( ) Não
Quantas horas você trabalha por dia: _____
Quantos anos completos você estudou: _____
De forma geral sua saúde está:
( )Excelente ( ) Muito boa ( )Boa ( )Regular ( )Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros parses. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **NORMAL**, **USUAL** ou **HABITUAL**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:
• atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUlTO mais forte que o normal
• atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respira UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

1a. Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que faça você suar **BASTANTE** ou aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por semana ( ) Nenhum

1b. Nos dias em que você faz essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades **por dia**?
horas: _____ minutos: _____

2a. Em quanto dias de uma semana normal, você realiza atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal e no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que faça você suar leve ou aumentem **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)
dias _____ por **SEMANA** ( ) Nenhum

2b. Nos dias em que você faz essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades **por dia**?
horas: _____ minutos: _____

3a. Em quantos dias de uma semana normal você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?
dias _____ por **SEMANA** ( ) Nenhum

3b. Nos dias em que você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gasta caminhando **por dia**?
horas: _____ minutos: _____

4a. Estas últimas perguntas são em relação ao tempo que você gasta sentado ao todo no trabalho, em casa, na escola ou faculdade e durante o tempo livre, Isto que você gasta sentado no escritório ou estudando, fazendo lição de casa, visitando amigos, lendo e sentado ou deitado assistindo televisão,

Quanto tempo **por dia** você fica sentado em um dia da semana?
horas: _____ minutos: _____

4b. Quanto tempo **por dia** você fica sentado no final de semana?
horas: _____ minutos: _____

Fonte: Matsudo*et al*, Atividade Física e Saúde, 2001.

ANEXO IV

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

ESCALA DE BRISTOL

Nome:_____Data: ____/____/____

➔ Marque a aparência que suas fezes costumaram apresentar durante esta semana:

Escala de Bristol			Data					
TIPO 1		Caroços duros e separados, como nozes (difíceis de passar)						
TIPO 2		Salsicha-moldada, mas granuloso						
TIPO 3		Como uma salsicha, mas com fissuras em sua superfície						
TIPO 4		Como uma salsicha ou serpente, suave e macio						
TIPO 5		Bolhas Suaves com bordas nítidas (que passa facilmente)						
TIPO 6		Peças Fofas com bordas em pedaços, um cocô sem consistência						
TIPO 7		Aquoso, Sem partes sólidas. Inteiramente líquido						

ANEXO V

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS GASTROINTESTINAIS

Nome:_____ Data: ____/____/____

➔ Com relação aos sintomas gastrointestinais em linhas gerais marque no quadro abaixo de acordo com a escala de 5 pontos.

Escala Likert de 5 pontos:

0	1	2	3	4
Nunca	Até 2 vezes na semana	3 a 4 vezes na semana	5 a 6 vezes na semana	Todos os dias da semana

De acordo com a escala acima marque com o X no ponto que equivale ao que sentiu durante esta semana:

Dor abdominal	0	1	2	3	4
Distensão abdominal	0	1	2	3	4
Desconforto abdominal	0	1	2	3	4
Flatulência	0	1	2	3	4
Ruídos estomacais ou intestinais digestivos	0	1	2	3	4

ANEXO VI

Pharmanostra®

CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	FOS (OLIGOFRUTOSE)				Pág 1
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHILE/BRASIL		**DATA DE ANÁLISE:**		15/09/2014
LOTE PHARMA NOSTRA:	14073496E		**LOTE FABRICANTE:**		PEXPK3CPK3.
DATA DE FABRICAÇÃO:	Novembro/2013		**DATA DE VALIDADE:**		Novembro/2016
CAS:	308066-66-2				
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA AMBIENTE				
DATA DE EMISSÃO:	24/09/2014	**NF:**	7-034.353	**ORDEM FRACIONAMENTO:**	6838-14

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Descrição*	Pó branco	Pó branco	Fabricante
pH*	5,0 - 7,0 (Solução 10% em água)	6,65	Fabricante
Matéria seca*	95,5% a 98,5% (4horas/70ºC à vácuo/3g)	96,86%	Fabricante
Condutividade	0,0 - 249,0 µS/cm	5,0 µS/cm	Fabricante
Oligofrutose (base seca)	93,2% - 100,0%	95,6%	Fabricante
Glicose + Frutose + Sacarose (base seca)	0,0% - 6,8%	4,4%	Fabricante
Limpidez da solução (10g/100g) *	A solução é limpida	Conforme	Fabricante
TESTES MICROBIOLÓGICOS			
Contagem total de bactérias*	≤ 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante
Fungos e Leveduras*	≤ 20 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante
Enterobactérias	Ausente	Ausente	Fabricante
Termófilos aeróbios totais	0 - 1000 UFC/g	0 UFC/g	Fabricante
Bacillus cereus	0 - 100 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante
TESTE ADICIONAL			
Densidade aparente*	Informativo (sem compactação)	0,75 g/mL	Mét. Geral FBV

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA) .

CONCLUSÃO: (X) Aprovado ( ) Reprovado

Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
João Paulo Sartin Mendes - CRF -GO: 7355

Responsável Técnico
Rodrigo Molinari Elias - CRF-GO Nº 3234

ANEXO VII

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Registro alimentar de 3 dias

Nome: _____

Data: _____/_____/_____ **Dia da semana:** _____

Refeição	Alimentos	Quantidade
Desjejum		
Hora:		
Local:		
Colação		
Hora:		
Local:		
Almoço		
Hora:		
Local:		
Lanche		
Hora:		
Local:		
Jantar		
Hora:		
Local:		
Ceia		
Hora:		
Local:		

Observações: _____
_____
_____

ANEXO VIII

European Journal of Clinical Nutrition
https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6

REVIEW ARTICLE

Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review

Louise Crovesy[1] · Daniele Masterson[2] · Eliane Lopes Rosado[1]

Received: 27 May 2019 / Revised: 4 March 2020 / Accepted: 6 March 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

Recently, relationship between gut microbiota composition and development of obesity has been pointed. However, the gut microbiota composition of individual with obesity is not known yet. Therefore, this systematic review aimed to evaluate differences in profile of gut microbiota between individuals with obesity and individuals with normal weight. A search performed on August 2019 in the databases Pubmed, Scopus, Web of Science, Cochrane library, Lilacs and gray literature using the terms: "microbiota", "microbiome", "obesity", "obesity morbid", and "humans". Studies assessing the gut microbiota composition in adults with obesity and lean were included. Quality assessment was performed by Newcastle–Ottawa Quality Assessment Scale. Of the 12,496 studies, 32 were eligible and included in this review. Individuals with obesity have a greater *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Mollicutes*, *Lactobacillus* (*reuteri*), and less *Verrucomicrobia* (*Akkermansia muciniphila*), *Faecalibacterium* (*prausnitzii*), *Bacteroidetes*, *Methanobrevibacter smithii*, *Lactobacillus plantarum* and *paracasei*. In addition, some bacteria had positive correlation and others negative correlation with obesity. Individuals with obesity showed profile of gut microbiota different than individual lean. These results may help in advances of the diagnosis and treatment of obesity.

Introduction

Obesity is a growing public health problem throughout the world, affecting 650 million adults worldwide. Obesity is difficult to control due to multiple etiological factors [1] and amongst the causes the gut microbiota has been highlighted [2].

The gut microbiota is composed mainly of bacteria followed by smaller proportions of fungi, virus and *Archea* [3]. The main phyla of bacteria in the gut microbiota are *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the most frequent in the microbiota, corresponding to 90% of the gut bacteria [4, 5].

On 2004, Bäckhed et al. [6] published the first article about the role of gut microbiota in the host metabolism, including body weight control. Animal model and humans' studies have been carried out to discover the composition of the gut microbiota associated with obesity [2, 7–10].

Experimental studies with animals have shown success in determining the association between the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio and obesity [2, 7, 8]. However, in humans this affirmation has not been confirmed [9–12]. In addition, other phyla and bacteria genera have been associated with obesity [11–14]. Therefore, we carried out a systematic review aimed to evaluate the differences between the profile of the gut microbiota of individuals with obesity and individuals with lean.

Methods

Search strategy and registration

A systematic review was carried out to answer the question: "Is the gut microbiota profile of individuals with obesity different of lean individuals?".

Supplementary information The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Louise Crovesy
louisecrovesy@yahoo.com.br

[1] Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[2] Library of Health Sciences Center, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Published online: 30 March 2020

Nutrition 67–68 (2019) 110547

Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrnl.com

Review

Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity

Louise Crovesy M.D. *, Eliane L. Rosado Ph.D.

Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:
Received 16 January 2019
Received in revised form 20 June 2019
Accepted 26 June 2019

Keywords:
Nutrigenetic
FTO
MC4R
Ghrelin
CCK
Leptin
Gene–diet interaction

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial, complex, and public health problem worldwide. Interaction between genes and environment as associated with diet may predispose an individual to obesity. In this sense, nutrigenetics appears to be a strategy that can improve understanding of the gene–diet interaction. The aim of this literature review was to summarize data from studies of genes involved in the regulation of energy intake (melanocortin 4 receptor [*MC4R*], fat mass and obesity-associated [*FTO*], ghrelin [*GHRL*], leptin [*LEP*], and cholecystokinin [*CCK*]) and diet interaction in obesity. The presence of polymorphisms in *MC4R*, *FTO*, leptin, and the respective receptor appear to be associated with higher energy and total lipid consumption. Polymorphisms in *FTO*, leptin, and leptin receptor are also related to increased intake of saturated fatty acids. Individuals with the *MC4R*, *FTO*, and ghrelin polymorphisms, who submitted themselves for weight loss intervention, appeared to achieve weight loss similar to individuals without polymorphisms in these genes. Additionally, protein seems to interact with these genes, which increases or decreases appetite, or to drive or lessen body weight recovery. Additionally, polymorphisms in these genes were found to be associated with inappropriate eating behaviors, such as increased consumption of sweets and snacks, consumption of large food portions, desire to eat, and eating associated with emotional issues. Preliminary data has supported the gene–diet interaction in determining weight loss and gain in individuals with polymorphisms in the genes involved in energy intake. Despite the advent of nutrigenetics in obesity, it is still too early to define the dietary management for weight loss based on the presence or absence of obesity polymorphisms.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obesity, which has increased worldwide and affects ~13% of adults, is characterized by excessive body fat due to energy imbalance caused by increased energy intake, decreased physical activity, or a combination of both [1]. The balance of energy is important for maintenance of body weight, which is the target of the treatment of obesity [2]. The etiology of obesity is multifactorial, involving gene–environment interactions [3], with environment being responsible for an increase in the prevalence of this disease [1].

Obesity may be monogenic when there is a polymorphism on an individual gene or chromosomal region related to the disease, or polygenic when the polymorphism occurs in a different gene related to the disease. The latter is the most common form, and alleles of various genes, each with little effect on body mass index (BMI), determine the weight of an individual [3].

Many genes associated with obesity are involved in the regulation of energy intake, lipid metabolism, adipogenesis, thermogenesis, adipocytokine synthesis, and transcription factors [3]. Energy intake is a crucial point in weight control and as such it is important to study polymorphisms in genes that regulate the interaction between energy intake and diet [4]. Among these genes are the melanocortin 4 receptor (*MC4R*) fat mass and obesity-associated (*FTO*) genes; leptin (*LEP*), ghrelin (*GHRL*), and their receptors; and cholecystokinin (*CCK*) [5–10]. In this context, nutrigenetics, which is the study of the effect of genetic variations on the nutritional requirements of an individual, can potentially improve the understanding of weight control and can contribute to personalized dietary management [3].

Recently, many reviews have been published about this subject. Reviews by Heianza and Qi [11] and Qi [12] verified the interaction between genes and diet and considered metabolome and gut microbiota and the effect of dietary intervention for weight loss and weight maintenance in the presence of polymorphisms, respectively. However, to our knowledge, no reviews have focused on the polymorphisms of genes involved in the interaction

* Corresponding author: Tel.: 55 (21) 3938-6601; Fax: 55 (21) 3938-6695.
E-mail address: louisecrovesy@yahoo.com.br (L. Crovesy).

https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.06.027
0899-9007/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal of Functional Foods 43 (2018) 123–130

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Unsaturated fatty acids do not have a favourable metabolic response in overweight subjects: Results of a meta-analysis

Junia Elisa Carvalho de Meira[a], Louise Crovesy[b,*], Anna Lúcia Andrade Santos[b], Cíntia Chaves Curioni[c], Eliane Lopes Rosado[b]

[a] Federal University of Alagoas, Alagoas, Brazil
[b] Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Departamento of Social Nutrition, Institute of Nutrition, University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Dietary fatty acids
Unsaturated fatty acids
Energy metabolism
Overweight

ABSTRACT

Background: Degree of saturation appears to have different effects on energy metabolism, which can help weight loss. The aim of study was to evaluate the influence of meals/dietary fats on energy metabolism of overweight subjects.

Methods: Systematic review and meta-analysis were conducted in the MEDLINE, Web of Science, Lilacs and Scopus database until January 2018 without language restriction. Randomized and controlled clinical trials with overweight adult subjects in whom evaluated diet or meal high PUFA, MUFA and SFA on energy metabolism was included. Study design, population, intervention and outcomes were abstracted from studies. Assessment for bias was conducted in identified trials. Data were analysed by difference between averages. Heterogeneity were performed and I^2 values greater than 50% showed heterogeneity.

Results: Energy expenditure (EE) did not change when compared MUFA and PUFA with CHO and SFA. Based on the meta-analysis, there is no scientific evidence demonstrating that unsaturated fatty acids (UFA) present favourable metabolic response in overweight individuals. Lipid, regardless of the presence of unsaturation is a macronutrient that provides a lower EE compared to CHO.

Conclusion: Scientific evidence did not sustain that unsaturated fats present favorable metabolic response in overweight subjects.

1. Introduction

Obesity is defined as the excess of body fat resulting from an imbalance between energy intake and energy expenditure (EE). In the longterm (World Health Organization (WHO), 1998), this can be associated with some clinical, psychological, and social complications (Bray, 1992). It has multifactorial origins, resulting from a combination of genetic predisposition and lifestyle, which has been regarded to be responsible for the growth of obesity in the population (Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística (IBGE), 2009; World Health Organization (WHO), 2003).

Environmental factors, particularly the diet, may influence the regulation of intake and EE (Westerterp-Plantenga, Fredix, & Steffens, 1994), mainly because obese individuals may have a high energy intake and often have a preference to intake foods that are high in energy density and fats, compared to non-obese subjects (Jonhson, Friedman, Harvey-Berino, Gold, & McKenzie, 2005; Westerterp-Plantenga et al., 1998).

When compared to other macronutrients, studies show that fat intake is directly involved in the origin of obesity for promoting less satiety, showing higher energy density and low oxidative priority (Alfenas & Mattes, 2003; Rosado & Monteiro, 2001). These result in passive energy intake and favor the emergence and maintenance of overweight and obesity (Alfenas & Mattes, 2003; Rosado & Monteiro, 2001). However, their quality should also be considered in the origin of obesity and its complications.

Studies that evaluated (Hunter, Crosbie, Horgan, Miller, & Dutta-Roy, 2001; Jones, Jew, & AbuMweis, 2008; Lawton, Delargy,

Abbreviations: CHO, carbohydrate; CI, confidence interval; BMI, body mass index; EE, energy expenditure; IV, inverse variance; MD, Mediterranean diet; MUFA, monounsaturated fatty acids; N, number; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RQ, respiratory quotient; SD, standard derivation; SFA, Saturated fatty acids; TEF, thermic effect of food; UFA, unsaturated fatty acids

* Corresponding author at: 373 Carlos Chagas Filho Avenue, Health Science Center, Federal University of Rio de Janeiro, Block J, 2° Floor, Fundão Island, Rio de Janeiro, RJ Zip Code: 21941-590, Brazil.
E-mail address: louisecrovesy@yahoo.com.br (L. Crovesy).

https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.008
Received 1 December 2017; Received in revised form 7 February 2018; Accepted 7 February 2018
1756-4646/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICES

APÊNDICE I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E DIETÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, Conselho Nacional de Saúde

Dados de identificação

Título do projeto: Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.

Versão: 04 de junho de 2014.

Pesquisadores: Louise Crovesy de Oliveira e Marjorie Ostrowski

Instituição a que pertence o Pesquisador responsável: Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Telefones para contato: (21) 99831-4698 (Louise), (21) 99993-6782 (Marjorie), (21) 98105-4499 (Eliane), (21) 99882-8307 (Márcia), (21) 3938-6599 (Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ).

Nome da Voluntária: _____

Idade:_____ anos R,G,_____

Termo de Esclarecimento

A Srª. está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa "Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas", aos cuidados das pesquisadoras Louise Crovesy de Oliveira, Marjorie Ostrowski, Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes. O estudo tem como objetivo avaliar a influência de probiótico (bactérias que fazem bem para o corpo humano) e simbiótico (probiótico + prebiótico, que são fibras) na perda de peso. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem ajudar no tratamento da obesidade.

A Srª. deverá inicialmente comparecer ao Laboratório de Avaliação Nutricional (LANUTRI) na UFRJ para a coleta de dados referente a este estudo. Será necessário responder a um questionário de informações gerais, que contém questões a respeito da sua alimentação, doenças e remédios utilizados.

Na segunda consulta, a Srª. deverá chegar ao LACFAR, em jejum de 12 horas para coleta de 25 mL de sangue (6 tubos, sendo 4 tubos menores com 4 mL de volume e 2 tubos maiores com 9 mL de volume) para avaliar o açúcar, insulina, gordura no sangue e substâncias produzidas pelo seu corpo. Esta coleta de sangue será repetida no final da intervenção, após 2 meses, Também será coletado 4 mL (1 tubo de 4 mL) de sangue após 30 dias de intervenção. Em seguida as pesquisadoras irão acompanhar a Srª. até o LANUTRI, onde serão medidos o peso, altura e em volta da cintura, composição corporal,

que irá medir a quantidade de gordura e músculo do seu corpo, também deverão trazer as três anotações do que foi consumido ao longo de um dia e a amostra de fezes, para avaliar as bactérias presentes.

O sangue coletado será utilizado apenas para esta pesquisa e será coletado na sua veia, no local onde comumente se coleta o sangue no braço, por pessoal devidamente treinado, com limpeza do local que o sangue será coletado e higiene, seguindo todas as normas de segurança, utilizando material que serão utilizados apenas uma vez e jogado no lixo após o uso.

Ao final, a Sra, receberá cápsulas e sachês para ingerir diariamente durante 60 dias. Serão marcadas consultas de 15 em 15 dias para avaliar seu peso, medida em volta da cintura, esclarecer dúvidas em relação ao estudo e entrega de cápsulas e sachês para os próximos 15 dias.

O primeiro e penúltimo encontros, nos quais serão realizadas todas as avaliações, deve demorar aproximadamente 4 horas, incluindo o tempo para a realização de cada etapa e o tempo de espera para o início de cada avaliação. Já nas consultas que acontecerão de 15 em 15 dias e no último encontro, que será após 15 dias do término da intervenção, o tempo de duração deve ser de aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

A Srª. não sofrerá nenhum risco com a participação no estudo. Os desconfortos associados com a coleta de sangue são a possível ardência no local durante a coleta e o aparecimento de mancha roxa na pele após a coleta, que desaparecerá sozinha. A bioimpedância elétrica consiste na passagem de corrente elétrica de baixa intensidade pelo seu corpo, porém não oferece nenhum risco ou desconforto. Para este exame a Srª. ficará deitada em uma maca por 10 minutos em uma sala reservada para este exame. A medida do peso, altura, em volta da cintura, anotações do consumo alimentar de um dia inteiro e coleta de fezes não ofereceram riscos ou desconfortos a Srª. Para realização destas avaliações serão necessárias apenas a colaboração e a memória da Srª. Todos os questionários serão respondidos pela Srª. em uma sala separada, somente na presença do pesquisador, para evitar quaisquer tipos de constrangimento que alguma questão possa causar. Além disso, a Srª. pode ter transtorno por conta do tempo gasto com os procedimentos e consultas durante a pesquisa.

Todo material coletado será utilizado apenas para esta pesquisa. Os resultados da pesquisa serão fornecidos somente no final do estudo, quando a Srª. terá orientação nutricional para ajudar no seu tratamento, baseando-se nos resultados obtidos no estudo e em orientações sobre a ingestão alimentar estabelecidas.

Em qualquer etapa do estudo, a Srª. terá acesso ao profissional responsável que poderá ser encontrado nos telefones: (21) 3938-6599 (Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ), (21) 98105-4499 (Drª. Eliane), (21) 9993-67827 (Drª. Márcia), (21) 99993-6782 (Nutricionista Marjorie) ou (21) 99831-4698 (Nutricionista Louise). Se a Srª. tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) situado à Rua Professor Rodolfo Paulo Rocco, 255 - Cidade Universitária – sala 01D – 46 – 1º andar, telefone (21) 2562-2480 – E-mail: ccp@hucff.ufrj.br.

É garantida a liberdade de querer não participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Os resultados serão analisados em conjunto com os resultados de outras voluntárias, não sendo divulgada a identificação de nenhuma voluntária. Os resultados serão apresentados em revistas e congressos científicos.

Todos os dados da Srª. serão avaliados somente pelos pesquisadores deste estudo e não será permitido que outras pessoas vejam seus resultados, garantindo proteção contra qualquer tipo de discriminação.

A Srª. poderá, em qualquer momento do estudo, pedir informações e até se atualizar quanto aos resultados parciais da pesquisa.

Esta pesquisa não lhe trará despesas, ou seja, a Srª. não pagará pelos exames e pelas demais avaliações. Também não terá compensações financeiras relacionadas à sua participação durante e ao final do estudo.

Caso ocorra algum dano pessoal resultante do estudo a Srª. terá direito ao atendimento pelos pesquisadores ou encaminhamento na Instituição.

Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com a Drª. _____, sobre a minha decisão em participar nesse estudo, Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar a última folha.

_____

Nome do voluntário

_____ Data: ___/___/_____

(assinatura do voluntário)

_____

Nome do pesquisador responsável

_____ Data: ___/___/_____

(assinatura do pesquisador responsável)

APÊNDICE II

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

QUESTIONÁRIO DE DADOS GERAIS

Grupo:_____

1. Identificação:

Nome: _____

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino Idade: _____anos Data de nascimento: __/__/__

Endereço:_____

_____

Telefones: _____

Nacionalidade:_____ Naturalidade: _____

Até que série você estudou (escolaridade)? _____

Qual sua ocupação atualmente (profissão)?_____

Qual o seu estado civil atualmente? ( ) *1 = casado (a) ou vive com companheiro (a); 2 = solteiro (a); 3 = separado (a), divorciado (a); 4 = viúvo (a)*

Quando começou a ganhar peso (engordar)? ( ) *1 = infância; 2 = adolescência;3 = idade adulta; 4 = gestação*

Você já engravidou? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Quantas vezes engravidou (incluir abortos e nascidos mortos)? _____

Quantos filhos teve? _____ Intercorrências na(s) gestação(ões): _____

Quantos quilos ganhou em cada gestação? 1ª_____ 2ª _____ 3ª_____ 4ª _____

Você ainda menstrua? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Sua menstruação é regular? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Utiliza pílula anticoncepcional?( ) *1 = sim; 2 = não* Qual? _____

Qual o foi o 1º dia da sua última menstruação? _____ Obs: _____

Atualmente, você fuma? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Já fumou antes? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Por quanto tempo fumou? _____ Há quanto tempo parou de fumar? _____

Consome bebidas alcoólicas atualmente? ( ) 1 = sim; 2 = não

Bebida	Frequência	Quantidade

→ Algum parente está participando da pesquisa? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Grau de parentesco: _____

Por qual tipo de parto você nasceu? ( ) *1 = cesária; 2= normal*

Tempo de gestação:_____
Aleitamento materno? ( ) *1 = sim; 2 = não* Duração: _____
Fórmula infantil? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Observações: _____
_____
_____

2. Avaliação clínica
Você costuma ter vômitos regularmente? ( ) 1 = *sim*; 2 = *não*
Você costuma ter diarreia regularmente? ( ) 1 = *sim*; 2 = *não*
Seu hábito intestinal é diário? ( ) 1 = *sim*; 2 = *não*Obs:_____
Edema MMII: ( ) *1 = sim; 2 = não*Obs: _____
Outros sintomas: _____

3. Uso de medicamentos (atuais e nos últimos 3 meses): ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
(Perguntar sobre o uso de laxantes e anti depressivos)

4. Uso de suplementos dietéticos (atuais e nos últimos 3 meses): ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
(Perguntar sobre a inclusão de outros alimentos (ex: óleo de coco) ou produto na alimentação)

5. Uso de iogurte: () *1 = diariamente; 2 = eventualmente*
Quantidade ingerida? _____

6. História de doença atual:
Atualmente, quais problemas de saúde que você possui?
( ) DM ( ) HAS ( ) Doenças articulares ( ) Cardiopatias
( ) SOP ( ) Dilipidemia ( ) Outras:_____

7. História patológica pregressa:
_____
_____
_____

8. História familiar de excesso de peso ou obesidade:
Pai ( ) Mãe ( ) Irmãos ( )

9. História familiar de doença inflamatória intestinal (doença de Crohn ou Retocolite ulcerativa):
Pai ( ) Mãe ( ) Irmãos ( )

10. Avaliação antropométrica e composição corporal:

Parâmetros	Datas de realização da avaliação					
Peso (kg)						
IMC (kg/m²)						
Perímetro da cintura 1 (cm)						
Perímetro da cintura 2 (cm)						
Perímetro da cintura (média)						
Pressão arterial (mmHg)						

Estatura 1 (cm): _____ Estatura 2 (cm): _____ Média da estatura (cm): _____

11. Avaliação dietética:

Possui alguma aversão, intolerância ou alergia alimentar?

_____

_____

_____

Alguém cozinha regularmente em sua casa? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Quem?_____

Que tipo de óleo ou gordura utiliza para o preparo dos alimentos?

_____

Qual o consumo mensal de óleo ou gordura? _____

Utilizam azeite? ( ) *1 = sim; 2 = não* Qual o tipo? _____

Qual o consumo mensal de azeite? _____

12. Perguntas a serem realizadas no dia do ensaio clínico:

1º Ensaio clínico (0 dia) - Data: ___/___/___

Você cumpriu o período de jejum para hoje? ( ) *1=sim; 2=não* Inicio do jejum: _____

Avaliar edema MMII: ( ) *1 = sim; 2 = não*Obs: _____

Usou medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Quais? _____

_____

Esteve em período mesntrual nos últimos 7 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Está menstruada hoje? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Qual foi a data do 1º dia de sua última mesntruação? _____

Sua menstruação está prevista para os próximos 7 dias (1 semana)? ( ) *1=sim; 2=não*

2º Reconsulta (15 dias) - Data: ___/___/___

Uso de medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*

Quais? _____

Quantidade de cápsulas: _____ Quantidade de sachês: _____

3º Reconsulta (30 dias) - Data: ___/___/___
Uso de medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
_____
Quantidade de cápsulas: _____ Quantidade de sachês: _____

4º Reconsulta (45 dias) - Data: ___/___/___
Uso de medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
_____
Quantidade de cápsulas: _____ Quantidade de sachês: _____

5º Ensaio clínico (60 dias) - Data: ___/___/___
Você cumpriu o período de jejum para hoje? ( ) *1=sim; 2=não* Inicio do jejum: _____
Avaliar edema MMII: ( ) *1 = sim; 2 = não*Obs: _____
Uso de medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
_____
Quantidade de cápsulas: _____ Quantidade de sachês: _____
Esteve em período mesntrual nos últimos 7 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Está menstruada hoje? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Qual foi a data do 1º dia de sua última mesntruação? _____
Sua menstruação está prevista para os próximos 7 dias (1 semana)? ( ) *1=sim; 2=não*

6º Reconsulta (15 dias após término de tratamento) – Data: ___/___/___
Uso de medicamento nos últimos 15 dias? ( ) *1 = sim; 2 = não*
Quais? _____
_____

13. Avaliação da composição corporal por BIA:

Parâmetros	**Data/Hora de realização da avaliação**	
Ângulo de fase (^{0})		
Capacitância do corpo (pF)		
Resistência (ohms)		
Reactância (ohms)		
Massa celular corporal (kg)		
Massa celular corporal (%)		
Massa magra (kg)		
Massa magra (%)		
Massa gorda (kg)		
Massa gorda (%)		
ME/MCC		
TMB (segundo BIA)		
Água intracelular (L)		
Água intracelular (%)		
Água extracelular (L)		
Água extracelular (%)		
Água corporal total (L)		
ACT/Massa magra		
ACT/Peso total		

14. Avaliação laboratorial:

Parâmetros	**Data/Hora de realização da avaliação**	
Glicose jejum (mg/dL)		
Hemoglobina glicada (%)		
Insulina jejum (µU/mL)		
HOMA-IR		
Colesterol total (mg/dL)		
HDL-c (mg/dL)		
LDL-c (mg/dL)		
VLDL-c (mg/dL)		
Triglicerídios jejum (mg/dL)		

APÊNDICE III

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Grupo: _____

Nome:_____ Data:__/__/__

Alimento	**Quantidade**	**1 ou + vezes por dia**	**5 a 6 vezes na semana**	**2 a 4 vezes na semana**	**1 vez por semana**	**2 a 3 vezes por mês**	**Raro/ Nunca**
Chicória							
Alho-poró							
Alho							
Banana							
Cebola							
Tomate							
Beterraba							
Aspargo							
Alcachofra							
Yacon							
Centeio							
Aveia							
Trigo							
Mel							
Cerveja							
Açúcar mascavo							

APÊNDICE IV

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Orientações para o preenchimento do registro alimentar de 3 dias

É de suma importância para a pesquisa a sua colaboração no preenchimento deste formulário, Mantenha o formulário de registro alimentar sempre com você e registre alimentos e bebidas consumidas ao longo do dia e da noite, As informações aqui fornecidas serão usadas exclusivamente para fins estatísticos e serão mantidas em sigilo, Abaixo seguem algumas orientações quanto ao preenchimento dos registros alimentares e logo após há um exemplo de como realizar o registro, Muito obrigada por sua colaboração e qualquer dúvida durante o preenchimento dos registros, por favor, entrar em contato: (21)99831-4698 (Louise), (21)99993-6782 (Morjorie),

- **Atenção!** Leia atentamente as instruções e não deixe de preencher nenhum dos registros alimentares.
- Anote todos os alimentos e bebidas consumidas tanto no domicílio quanto fora, com exceção da água.
- Faço o registro de três dias alternados, sendo dois dias de semana e um final de semana ou feriado, com intervalo de no mínimo 1 dia entre eles.
- Procure registrar os alimentos ou preparações separadamente (exemplo: arroz separado do feijão; pão separado da manteiga).
- Coloque as quantidades em medidas caseiras, especificando o utensílio utilizado e se este estava cheio, raso ou pela metade (Exemplo: 4 colheres de sopa de arroz cheia).
- Em caso de margarina, requeijão ou geléia, se não souber informar a quantidade através de medidas caseira pode-se utilizar a descrição pouca, média ou grande quantidade.
- Caso registre algum alimento que não possua medida caseira, registre a quantidade utilizando objetos conhecidos (Exemplo: caixa de fósforo, tampa de caneta, etc).
- Em caso de consumo de um prato elaborado preparado em casa, por exemplo: bolo, torta salgada, etc, favor escrever a receita no verso da folha do registro alimentar. **Importante**: ao escrever a receita indicar o rendimento da preparação em medidas caseiras (Exemplo: 1 tabuleiro grande, 5 taças).
- No caso dos produtos industrializados, informar a marca do produto, a quantidade consumida em medidas caseiras e/ou gramas (g) ou mililitros (mL) e se é light ou diet; integral, semi-desnatado ou desnatado.
- Informar a quantidade de açúcar adicionada a alimentos e bebidas.
- Sempre relatar a forma de preparo dos alimentos, se assado, grelhado, frito, cozido, refogado, à milanesa, à vapor, etc.
- Não se esqueça de anotar hora e local onde a refeição foi realizada. No caso do local, utilize as seguintes letras para o preenchimento: **D** para quando o alimento for proveniente do domicílio e **F** para quando o alimento é adquirido e consumido fora do domicílio.
- Não se esqueça de realizar as anotações logo após a refeição!

APÊNDICE V

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

***Checklist* do Registro alimentar de 3 dias**

1. Conferir se a voluntária colocou o nome, o dia e o dia da semana em todas as folhas dos registros.
2. Verificar se o preenchimento foi realizado em 1 dia do final de semana ou feriado e 2 dias durante a semana.
3. Verificar se há pelo menos 1 dia de intervalo entre os dias registrados.
4. Após início da intervenção: Verificar se há o registro das cápsulas.
5. Verificar se os alimentos foram registrados separadamente (exemplo: pão separado da manteiga), Caso não, verificar se há a medida caseira separadamente dos alimentos registrados juntos.
6. Verificar se todos os alimentos têm suas medidas caseiras correspondentes (exemplo: colher de arroz, colher de sopa).
7. Verificar se há a informação de cheio, raso, metade, pequeno, médio ou grande.
8. Verificar se foram registrados o uso de açúcar ou adoçante das bebidas.
9. Verificar, em caso de produtos industrializados, se é light ou diet ou zero; integral, semi-desnatado ou desnatado.
10. Verificar se foi informada a forma de preparo dos alimentos.
11. Se for encontrado um longo período de tempo sem registro, confirmar com o voluntário se não houve ingestão de nenhum alimento ou bebida neste período.
12. Verificar no caso de preparações elaboradas se tem a receita anotada no registro com as medidas caseiras, seu rendimento e a medida caseiro do que foi consumido pelo voluntário.
13. Verificar se as medidas caseiras da receia é referente ao alimento cru ou cozido.
14. Questionar sobre alimentos comumente esquecidos, tais como: balas, chicletes, chás e cafezinhos adoçados com açúcar.

APÊNDICE VI

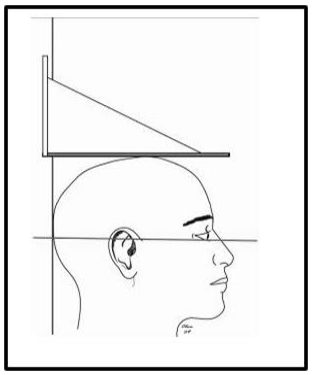
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Protocolo para avaliação antropométrica

- **Medida da estatura**

Esta medida deve ser realizada duas vezes, e média será utilizada nas análises. É admitido uma diferença entre as duas medidas de até 0,5 cm, no caso de a diferença ser superior a 0,5 cm, devem ser realizadas duas novas aferições da estatura.

1. Posicionar a voluntária descalço, em cima e no centro do equipamento, com os pés juntos, ereto, braços estendidos ao longo do tronco e cabeça erguida.
2. A voluntária deve manter calcanhares, panturrilha, nádegas, ombros e parte posterior da cabeça em contato com o antropômetro.
3. Posicionar a cabeça da voluntária de forma que esta fique no Plano de Frankfort (uma linha imaginária que passa pela borda superior do trágus e no ponto mais baixo na margem da órbita, na altura do forame intraorbitário).



4. Abaixar a haste móvel do equipamento até que se aproxime da cabeça do voluntário.
5. Solicitar que a voluntária inspire profundamente, sem sair da posição. Abaixar a haste do equipamento até tocar a parte superior da cabeça do voluntário.
6. Realizar a leitura da estatura ao nível dos olhos, e anotar o resultado na ficha.

- **Medida do peso corporal**

1. Solicitar que a voluntária fique descalço e retire casacos, relógio, celular, carteira, entre outros.
2. Solicitar que a voluntária suba na balança, posicionando-o de costas para o visor da balança, no centro da balança, ereto, com braços estendidos ao longo do tronco e distribuindo o peso entre as duas pernas.

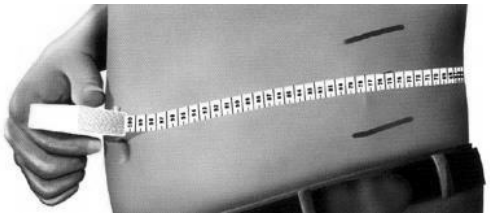
3. Solicitar que permaneça imóvel, realizar a leitura do peso e registrar o mesmo na ficha da voluntária.

- **Medida do perímetro de cintura**

Esta medida deve ser realizada duas vezes e a média destas será utilizada para as análises. É admitido uma diferença entre as duas medidas de até 1 cm, no caso de a diferença ser superior a 1 cm, deve ser realizada duas novas medidas da cintura.

1. Posicionar a voluntária de pé, com os pés juntos, ereto, com o abdômen relaxado e os braços cruzados sobre o peito.
2. Afastar a roupa de tal forma que a cintura fique a mostra. Nunca realizar a medida sobre a roupa.
3. Localizar a margem da última costela por meio de palpação e marcá-la com caneta. Transferir o ponto para a linha axilar média.
4. Localizar a crista ilíaca, por meio de palpação, na linha axilar média e marcá-la com caneta.
5. Medir a distância entre os dois pontos marcados na linha axilar média e marcar o ponto médio entre eles com a caneta.

6. Manter-se de frente para a voluntária, colocar a fita sobre o ponto médio e passar a fita ao redor da cintura.
7. Verificar se a fita se encontra no mesmo nível em todo o perímetro da cintura. A fita não deve estar frouxa e nem apertada.



8. Solicitar que a voluntária inspire e expire, e realizar a leitura após o término da expiração.
9. Registrar a medida encontrada na ficha da voluntária.
10. Repetir a medida.

APÊNDICE VII

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Protocolo para avaliação da composição corporal

Recomendações

- O exame deve ser agendado para a fase folicular do ciclo menstrual, ou seja, entre 10 a 12 dias após o primeiro dia da última menstruação.
- Procurar realizá-lo sempre no mesmo horário.
- A voluntária deve utilizar roupas leves, e estar sem meias ou sapatos durante o exame.
- Solicitar que a voluntária retire relógio, bijuterias e demais objetos de metal.
- Medir sempre do lado direito do corpo. Em caso de impossibilidade de realizar do lado direito, realizar do lado esquerdo em todas as avaliações.
- Não permitir contato de nenhuma parte do corpo com objetos ou estruturas de metal.
- Registrar na ficha caso o voluntário apresente edema.

Passo a passo para realização da BIA

1. Solicitar que a voluntária urine antes da realização do exame.
2. Limpar a maca com álcool 70% e forrá-la.
3. Solicitar que a voluntária retire relógio, bijuteirias e demais objetos de metal que esteja usando.
4. Colocar a voluntária em posição supina, e mantê-la nesta posição de 5-10 minutos antes do início do exame.
5. Manter o braço direito doa voluntário afastado do tronco cerca de 30° e as pernas afastadas cerca de 45°.
6. Fazer assepsia com álcool 70% da mão e pé onde serão fixados os eletrodos.
7. Fixar os eletrodos na mão e pé do voluntário, preferencialmente no lado direito.

Atenção! O fio vermelho do cabo deve sempre estar mais próximo ao coração

8. Digitar as informações solicitadas no aparelho (sexo, idade, peso (kg) e estatura (cm)), e iniciar o exame.
9. Imprimir os resultados e anotá-los na ficha da voluntária.

APÊNDICE VIII

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado e Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Protocolo para medida da Pressão Arterial (PA)

Preparo do paciente:
1. Explicar o procedimento ao paciente;
2. Solicitar que o paciente esvazie a bexiga, se necessário;
3. Antes da medida, manter o paciente em repouso de pelo menos 5 minutos;
4. Manter pernas descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado;
5. Remover roupas ou afrouxar a manga na parte superior do braço no qual será colocado o monitor.

Procedimento de medida da PA:
1. Verificar se o plugue de ar está inserido de forma segura na unidade principal. Colocar a braçadeira na parte superior do braço esquerdo do paciente, de modo que a seta azul e o tubo de ar fiquem centralizados na parte interna (posterior) do braço e alinhados com o dedo médio. A parte inferior da braçadeira deve ficar cerca de 1,30 cm acima do cotovelo. Envolver a braçadeira firmemente em torno do braço, usando o velcro. Não deixar folga no bracelete.
2. Conferir a postura do paciente (item 4).
3. Apoiar o braço do paciente sobre uma mesa e posicioná-lo na altura do coração (nível do ponto médio do esterno ou 4º espaço intercostal), com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente fletido. Cuidado para não deixar o braço do paciente apoiado sobre o tubo de ar. Solicitar que o paciente não fale e não se mova durante a avaliação.
4. Pressionar o botão START/STOP, a braçadeira começará a inflar automaticamente (o monitor determina o nível ideal). O paciente deve permanecer com o braço imóvel até que todo o processo de medição seja concluído. Caso seja necessário interromper a medição, pressionar o botão STAR/STOP.
5. Após o enchimento da braçadeira a medição será iniciada. Aparecerá uma contagem decrescente no visor. Quando a medição estiver concluída, a braçadeira será totalmente desinflada e serão exibidas a pressão arterial e a frequência cardíaca.
6. Anotar os resultados da avaliação na ficha do paciente e pressionar START/STOP para desligar o monitor. Ao final de todas as medidas, remover as pilhas do monitor.
7. Esperar 1 a 2 minutos antes da próxima medida. Repetir a avaliação mais duas vezes, registrar os valores e calcular a média das duas últimas, que será considerada a PA do

indivíduo. **OBS:** Na primeira avaliação, as medidas devem ser obtidas em ambos os membros superiores e, em caso de diferença, deve-se utilizar sempre o braço com o maior valor de pressão para as medidas subsequentes.
8. Informar os valores de PA obtidos para o paciente.

Observações:
1) Caso a pressão sistólica do paciente normalmente seja maior que 220 mmHg, mantenha pressionado o botão START/STOP até que o monitor encha 30 a 40 mmHg a mais que a pressão sistólica suspeita.
2) O monitor calcula uma leitura média com base nos valores das três medições executadas mais recentemente no intervalo de 10 minutos desde a leitura mais recente. Data e hora devem ser configuradas para que os valores de medição e o valor médio sejam armazenados.
3) O botão MEMÓRIA exibe os valores de medição mais recentes na tela. Pressione o botão várias vezes para exibir os próximos valores. Para excluir todos os valores armazenados na memória mantenha pressionados os botões MEMORY e START/STOP simultaneamente por mais de 2 segundos.

Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório

Classificação	Pressão arterial sistólica (mmHg)	Pressão arterial diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

Fonte: MALACHIAS *et al.*, 2016

APÊNDICE IX

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Projeto: Influência de probiótico e simbiótico na microbiota intestinal, perda de peso, glicemia e lipemia de mulheres obesas.
Coordenação: Profª. Drª. Eliane Lopes Rosado

Protocolo de preparo de amostra e análise de metabolômica

1- **Protocolo de preparo da solução tampão**

Material para preparo de 1 L de solição tampão de 100mM de fosfato de sódio pH 7,4:
Reagente A: Fosfato de sódio monobásio (NaH2Po4):
Hidratado (H2O) - 3,1 g
Anidro (sem água) - 2,7 g
Reagente B: Fosfato de sódio dibásio (Na2HPo4):
Hidratado (12H2O) - 27,495 g
Anidro (sem água) - 10,9 g
Óxido de deutério (D2O) - 20% da solução
Água destilada

Modo de preparo
1° Pesar, separadamente, os dois reagentes em vidro de relógio diferentes.
2° Em um balão volumétrico com capacidade de 1 L colocar o óxido de deutério. No caso de preparar quantidade pequena, exemplo 20 mL, pode utilizar o tubo de Falcon para o preparo.
3° Adicionar os reagentes pesados ao D2O.
4° Avolumar até 1 L com água destilada.
5° Armazenar a solução sob refrigeração.

2- **Protocolo de prepara da amostra para análise por ressonância magnética nuclear (RMN)**

1° Retirar as amostras aserem analisadas do freezer -80°C e colocá-las em uma estante para eppendorfs. Para manipular as amostras estas devem estar descongelada, caso na hora de aliquotar ainda estiver congelada, será necessário esfregar as mãos em torno do tubo.
2° Aliquotar 330 microlitros (µL) de soro em eppendorfs previamente identificados.
3° Aliquotar 330 µL da solução tampão e adicionar ao soro.
4° Centrifugar as amostras a 10000 xg, 4°C por 10 minutos.
5° Aliquotar 600 microlitos, utilizando uma pipeta de 200 µL (3 vezes), o conteúdo do eppendorf para o tubo de RMN, previamente identificados. Atenção: cuidado para não pipetar o precipitado que fica no fundo do eppendorf.

3- **Descarte da sobra de soro do eppendorf**
1° Adicionar hipoclorito à amostra de soro que sobrou até quase encher o eppendorf.
2° Fechar o tubo e descartar na lixeira de material biológico.

4- **Protocolo de análise na ressonância magnética nuclear (RMN)**
1° Abrir o programa TopSpin, se não estiver aberto.
2° Verificar a temperatura do equipamento. Deve estar em 300°K. Caso não esteja na temperatura adequada de análise, dar duplo clique em "Sample temperature", clicar em "set" na janela que abrir e alterar o valor.
3° Verificar se há tubo no magneto. Para isso, clicar, na barra superior, em "Acquire" -> "Sample" →"Turnon" Se tiver o tubo irá subir podendo ser retirado. Depois clicar, na barra superior, em "Acquire"→"Sample"→ "Turn off".
4° Clicar na pasta "El Bacha" e buscar a pasta que contém mesus experimentos.
5° Na barra inferior, digitar o comando "edc" para criar um novo experimento. Irá abrir uma janela que contém os seguintes dados:
NAME: nome da pasta do experimento a ser realizado (conferir se está correto)
EXPNO: colocar o número do experimento a ser realizado
OPTIONS → Set solvent: H2O + D2O
DIR: localização do experimento no programa
TITLE: colocar o número do tubo, a identificação do voluntário, tempo do estudo
Após fizer as alterações, clicar em OK.
6° Selecionar a pasta do experimento, clicando com o botão direito e em "Display", para selecioná-la.
7° Colocar o tubo no suporte, que deverá estar em 2 mL (altura em que a leitura é realizada pelo equipamento).
8° Clicar, na barra suprerior, em "Acquire" → "Sample" → "Turnon" e colocar a amostra no magneto, sem encostar no equipamento. Em seguida clicar, na barra superior, em "Acquire"→ "Sample" → "Turn off".
9° Após aparecer no quanto inferior esquerdo do programa "iffinished" pode começar a setaras condições do equipamento.
10° Digitar "lock" na barra inferior. Selecionar 90% H2O + 10% D2O. Aguardar aparecer "lockfinished" no canto inferior esquerdo. OBS: Na lateral direita do programa é possível verificar se o magneto identificou o D2O. Caso esta janela não esteja abert, basta digitar "lockdisp" na barra inferior.
11° Digitar "atma" na barra inferior. Este comando ajusta automaticamente para cada núcleo analisado. Esperaraparecer "job succeeded".
12° Clicar, nabarra superior, em "Acquire" → "Shim"→"Add top shim options… "→ "Open topshim…". Abrirá uma janela que terá:
DIMENSION: 1D
OPTIMISE FOR: 1H
TUNE→before: Z-X-Y
after: Z-X-Y-XZ-YZ-Z
PARAMETERS: se a caixa de shigemi estiver selecionada, é preciso clicar para tirar a seleção

Clica em “start” após realizar as alterações. Esperar aparecer “not running”.
13° Digitar “pulsecal” na barra inferior e gravar o último número que aparece na janela que abrir (9.alguma coisa).
14° Digitar na barra inferior “getprosol 1H n° do pulsecal”– exemplo: 10.6.
15° Digitar na barra inferior “zg” para iniciar a análise.
Observação: Overnight - para fazermais de uma análise seguida na mesma amostra, é necessário repetir o 14° passo nos dois experimentos que deseja realizar. Depois seleciona o primeiro experimento, clicando com o direito em “Display”, e digita na barra inferior “multizg”. Irá abrir uma janela, onde deverá digitar o número de experimentos a serem feitos em sequência na mesma amostra, no caso 2, e clica em “close”.
16° Ao concluir o experimento, o espectro deverá ser processado, digitando os seguintes comandos na barra inferior:
1- pro
2- abs
3-apk
Observação: no caso do *overnight* o processamento é feito pelo seguinte comando: xfb