



**MELISSA APARECIDA MORAIS**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO  
*LACTOCOCCUS LACTIS* (LMG 27352) EM PARÂMETROS  
CARDIOMETABÓLICOS ASSOCIADOS À OBESIDADE**

**LAVRAS-MG  
2021**

**MELISSA APARECIDA MORAIS**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO *LACTOCOCCUS LACTIS*  
(LMG 27352) EM PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS ASSOCIADOS À  
OBESIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Andrezza Fernanda Santiago  
Orientadora  
Profa. Dra. Camila Maria de Melo  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Morais, Melissa Aparecida.

Efeitos da Suplementação com Probiótico *Lactococcus Lactis*  
(LMG 27352) em Parâmetros Cardiometabólicos Associados à  
Obesidade / Melissa Aparecida Moraes. - 2021.

76 p.: il.

Orientador(a): Andrezza Fernanda Santiago.

Coorientador(a): Camila Maria de Melo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Fatores de Risco Cardiometabólico. 2. Probióticos. 3.  
Adiposidade. I. Santiago, Andrezza Fernanda. II. Melo, Camila  
Maria de. III. Título.

**MELISSA APARECIDA MORAIS**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO *LACTOCOCCUS LACTIS*  
(LMG 27352) EM PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS ASSOCIADOS À  
OBESIDADE**

**SUPPLEMENTATION EFFECTS OF *LACTOCOCCUS LACTIS* PROBIOTIC (LMG  
27352) ON CARDIOMETABOLIC PARAMETERS ASSOCIATED WITH OBESITY**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de dezembro de 2021.

Dr(a) Sandra Bragança Coelho UFLA

Dr(a) Sarah Leão Fiorini de Aguiar UNA



Profa. Dra. Andreza Fernanda Santiago  
Orientadora

Profa. Dra. Camila Maria de Melo  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela força e proteção em todos os momentos.

À minha família, em especial ao meu pai (in memoriam), pela inspiração, apoio e compreensão.

Às Professoras Dr<sup>a</sup> Andrezza Fernanda Santiago e Dr<sup>a</sup> Camila Maria de Melo pela orientação, direcionamento e apoio na realização deste projeto.

Às professoras da banca de qualificação, Dr<sup>a</sup> Juciane de Abreu Ribeiro Pereira e Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Pelissari Kravchychyn, pelas preciosas contribuições.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS) pela oportunidade desta pós-graduação.

À Prefeitura Municipal de Três Corações-MG, pela confiança e disponibilidade do servidor para o aperfeiçoamento profissional.

Aos participantes deste projeto pela colaboração.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

“A verdadeira coragem é ir atrás de seu sonho mesmo quando todos dizem que ele é impossível.” (Cora Coralina)

## RESUMO

**Introdução:** As alterações na microbiota intestinal desempenham um papel de destaque na fisiopatologia da obesidade e de doenças metabólicas, mas os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente descritos. Desta forma, a manipulação da microbiota intestinal se tornou uma possibilidade para intervenções, como potencial terapia para o tratamento da obesidade. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos moduladores da administração da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* (LMG 27352), nas variáveis de risco cardiometabólico em indivíduos com obesidade. **Métodos:** Foram selecionados 52 indivíduos adultos, obesos, frequentadores do CEM (Centro de Especialidades Médicas) do município de Três Corações-MG, que apresentavam circunferência da cintura elevada e algum fator de risco cardiometabólico associado à obesidade, sendo: pressão arterial > 130 mmHg (sistólica) ou > 85 mmHg (diastólica), triglicérides > 150 mg/dL, HDL-c < 40 mg/dL para homens, e < 50 mg/dL para mulheres, Glicemia > 100 mg/dl, ou em tratamento medicamentoso para estas alterações. Trata-se de um ensaio clínico randomizado, prospectivo, triplo cego e controlado por placebo com intervenção de 90 dias. Os voluntários foram randomizados em dois grupos: (i) placebo - receberam cápsulas com 20mg de celulose (n = 26) e (ii) probiótico - receberam cápsulas com o probiótico *Lactococcus lactis* (LMG 27352), uma concentração de  $2 \times 10^9$  UFC/dia, equivalente a 20mg (n = 26). Foram realizadas aferições antropométricas e avaliação da composição corporal por bioimpedância elétrica, aplicação de recordatórios alimentares de 24 horas e análises bioquímicas do perfil metabólico como: hemograma completo, glicose de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), insulina sérica, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c), triacilgliceróis (TGs), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutariltransferase (GGT), e cálculo do Homa-IR. O software SPSS (versão 20.0) foi utilizado para as análises estatísticas. **Resultados:** Dos 52 participantes, 41 (78,8%) foram do sexo feminino e 11 (21,2%) do masculino. Não foram encontrados efeitos significativos da suplementação sobre variáveis antropométricas e de composição corporal. Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados apenas a variável triglicérides apresentou alteração significativa após a suplementação com o probiótico, sendo a média encontrada no momento inicial de 135,4mg/dL e final de 164,1mg/dL (P = 0,010). O consumo alimentar dos participantes em relação ao valor energético foi semelhante nos dois momentos estudados, já o consumo de carboidratos aumentou em ambos os grupos durante a intervenção, e houve aumento no consumo de sódio no grupo probiótico. **Conclusão:** O tratamento com a cepa *Lactococcus lactis* por 12 semanas de forma isolada sem intervenção dietética, não demonstrou efeitos sobre parâmetros bioquímicos, antropométricos e de composição corporal em indivíduos com obesidade.

**Palavras-chave:** Adiposidade. Fatores de Risco Cardiometabólico. Microbioma Gastrointestinal. Probióticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The gut microbiota plays a prominent role in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases, but the mechanisms involved have not yet been fully described. Due to this fact, intestinal microbiota manipulations became a possibility for interventions, as a potential therapy for the treatment of obesity. The present study aimed to evaluate intake modulating effects of the probiotic bacterium *Lactococcus Lactis* in cardiometabolic risk variables in obese individuals. **Methods:** We selected 52 adult, obese individuals that attended the CEM (Medical Specialty Center) in the city of Três Corações-MG, who had high waist circumference, and some cardiometabolic risk factor associated with obesity, such blood pressure > 130 mmHg (systolic) or > 85 mmHg (diastolic), triglycerides > 150 mg/dL, HDL-c < 40 mg/dL for men, and < 50 mg/dL for women, Blood glucose > 100 mg/dl, or under drug treatment for these changes. This is a 90-day intervention, randomized, prospective, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. Volunteers were randomized into two groups: (i) placebo - received capsules containing 20mg cellulose/day (n = 26) and (ii) probiotic - received capsules containing 20mg of probiotic *Lactococcus lactis* (LMG 27352), at concentration of  $2 \times 10^9$  CFU / day (n = 26). Anthropometric measurements and body composition assessment were performed using electrical bioimpedance, application of 24-hour food records and biochemical analyzes of the metabolic profile such as: complete blood count, fasting glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), serum insulin, total cholesterol (CT), high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c), very low density lipoprotein (VLDL-c), triacylglycerols (TGs), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), range glutaryltransferase (GGT), and calculating the Homa-IR SPSS software (version 20.0) was used for statistical analysis. **Results:** Of the 52 participants, 41 (78,8%) were female and 11 (21,2%) were male. There were no significant effects of supplementation on anthropometric variables and body composition. In relation to biochemical parameters, only the triglyceride variable showed a significant change after probiotic supplementation, being the mean at the beginning 135.4mg / dL and the at end at 164.1mg / dL (P = 0.010). Food energy intake was similar in the two studied moments, but carbohydrates intakes increased in both groups during the intervention, and there was an increase in sodium consumption in the probiotic group. **Conclusion:** Treatment with the *Lactococcus lactis* strain for 12 weeks alone without dietary intervention did not show effects on biochemical, anthropometric and body composition parameters in obese individuals.

**Keywords:** Adiposity. Cardiometabolic Risk Factors. Gastrointestinal Microbiome. Probiotics.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Obesidade</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Microbiota intestinal</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Relação microbiota intestinal, obesidade e distúrbios metabólicos associados</b> ..	<b>13</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Fator adiposo induzido pelo jejum - (FIAF)</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Monofosfato - adenosina proteína quinase ativada (AMP-Q)</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Lipopolissacarídeos - LPS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Impacto da dieta na microbiota intestinal</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Probióticos e obesidade</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Protocolo e população de estudo</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Assuntos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Suplementação probiótica nos grupos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise antropométrica, de composição corporal e consumo alimentar</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Análises bioquímicas</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Cálculo amostral e métodos estatísticos</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização da Amostra</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Variáveis antropométricas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Composição corporal</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Parâmetros bioquímicos</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Consumo Alimentar</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	<b>49</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>73</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode ser prejudicial à saúde, e sua prevalência tem aumentado continuamente nas últimas quatro décadas, já sendo considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). A etiologia da obesidade é multifatorial e ambiental, que envolve o estilo de vida, mecanismos neuronais, hormonais, fatores genéticos e epigenéticos (DURANTI et al., 2017; KOBYLIAK et al., 2016 )

A obesidade leva à diminuição da qualidade de vida e aumento do risco de doenças crônicas degenerativas, como diabetes tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCVs), doença hepática gordurosa não alcoólica e certos tipos de câncer (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016). Desta forma, há uma necessidade crescente atualmente de se encontrar novos tratamentos que auxiliem na prevenção ou tratamento da obesidade.

Estudos mostram que alterações na composição e/ou estrutura da microbiota intestinal podem ter importantes repercussões na saúde e na doença, em que o desequilíbrio ou disbiose da microbiota intestinal tem sido associado à obesidade e a disfunções metabólicas relacionadas (LAU et al., 2019). A microbiota intestinal é definida como um órgão totalmente integrado ao hospedeiro, que desempenha papel importante em seu metabolismo, fisiologia, nutrição e funções imunológicas (HARO et al., 2017).

Evidências sugerem que a microbiota intestinal humana apresenta correlação direta com a fisiopatologia da obesidade, pois influencia o metabolismo energético, apetite, composição corporal, sinalização neuroendócrina e sensibilidade à insulina, por meio de vias gastrointestinais e modulação da comunidade bacteriana intestinal (KOBYLIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEVA, 2016; PEDROGO et al., 2019; GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2020). Estas funções metabólicas impactam significativamente no estado nutricional e de saúde do hospedeiro. Portanto, a microbiota pode ser responsável em parte pelas diferenças interindividuais nos resultados de intervenções direcionadas à obesidade (FABERSANI et al., 2019).

Estudos tem demonstrado uma redução na diversidade e riqueza da microbiota intestinal na obesidade, em que se observa uma proporção reduzida do filo *Bacteroidetes* e níveis mais aumentados de *Firmicutes*, porém, há muito a se debater ainda sobre a assinatura microbiana

exata da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis ou com obesidade (DAO; CLÉMENT, 2018; ABENAVOLI et al., 2019; VALLIANOU et al., 2019). A esse contexto, acrescenta-se o interesse das pesquisas no papel da microbiota intestinal como fator intermediário entre componentes ambientais e comportamentais, e a ocorrência da obesidade e dos distúrbios metabólicos entre os indivíduos, bem como o uso de probióticos na sua modulação.

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde dos indivíduos quando administrados em doses suficientes (FAO, 2006). Neste sentido, a suplementação com probióticos se torna interessante, pois os estudos apontam como vantagens: modificações da composição da microbiota intestinal, fortalecimento da barreira epitelial intestinal, adesão competitiva à mucosa intestinal, produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (ABENAVOLI et al., 2019; QUIGLEY, 2019; MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019).

Desta forma, os benefícios probióticos foram investigados no intuito de melhorar a função imunológica, diminuir a pressão sanguínea e melhorar o perfil lipídico. Estudos em modelos animais sugerem que os probióticos podem reduzir a glicose sanguínea e a resistência à insulina (RUAN et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração da bactéria probiótica *Lactococcus Lactis* (LMG 27352) nas variáveis de risco cardiometabólico associadas à obesidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Obesidade

A obesidade tem sido definida como uma síndrome epidemiológica mundial caracterizada pelo acúmulo de massa gorda, principalmente de gordura visceral (BRAY; KIM; WILDING, 2017). Segundo a pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças (VIGITEL) a prevalência de obesidade no país cresceu 67,8%, passando de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. Segundo gênero, houve aumento de 64% entre os homens (11,4% em 2006 e 18,7 % em 2018) e de 71,1% entre as mulheres (12,1% em 2006 e 20,7% em 2018) (BRASIL, 2020).

A obesidade está associada a uma maior propensão ao desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia, doenças cardiovasculares (DCVs) e câncer (GOMES et al., 2017). A cada ano, 28 milhões de indivíduos morrem em todo o mundo devido às consequências de sobrepeso ou obesidade, além disso, a doença tem acarretado um aumento substancial na carga médica, social e econômica (BRUSAFERRO et al., 2018). Desta forma, o aumento na incidência da obesidade tem encorajado estudos sobre novas estratégias que visam prevenir o ganho de peso e os distúrbios metabólicos induzidos pela adiposidade excessiva.

Evidências demonstram que o tecido adiposo não é apenas um órgão de armazenamento de energia, pois desempenha funções endócrinas e imunológicas ao secretar hormônios e citocinas, que implicam diretamente na função imunológica e homeostase energética nos indivíduos (FABERSANI et al., 2019). Durante o desenvolvimento da obesidade ocorre expansão dos adipócitos e o tecido adiposo é infiltrado por células inflamatórias, ocorrendo produção anormal de citocinas, e aumento dos marcadores pró-inflamatórios. Estas células inflamatórias infiltradas e adipócitos repletos de gordura secretam citocinas que são capazes de influenciar o metabolismo local e de todo o organismo estabelecendo um assim um quadro de inflamação crônica sub-clínica que está associada ao desenvolvimento de doenças e distúrbios metabólicos (CERDÓ et al., 2019). Diante deste fato, sugere-se que a obesidade acelera a incidência de DM2, através do aumento de citocinas pró-inflamatórias, que interferem na sinalização insulínica. Também ocorre nesta condição, um aumento da produção lipídica e consequente liberação de ácidos graxos livres, que causam lipotoxicidade e aparecimento de outras doenças crônicas como cirrose, fígado gorduroso, esteato-hepatite, acidente vascular

cerebral e insuficiência cardíaca, desenvolvimento de osteoartrite, refluxo gastroesofágico e apneia obstrutiva do sono (DURANTI et al., 2017; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017; SIVAMARUTHI et al., 2019).

A patogênese exata da obesidade permanece pouco clara, mas parece ser uma combinação complexa de muitos fatores como o desequilíbrio entre consumo e gasto de energia e interação entre suscetibilidade genética, fatores nutricionais, fisiológicos, sociais e ambientais (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016). Além disso, estudos têm demonstrado, que a falta de atividade física e os fatores alimentares estão entre os maiores responsáveis pelo aumento de obesidade na população, estando os hábitos alimentares intimamente relacionados a fatores geográficos, étnicos e culturais, e que representam um elemento importante para a constituição e função da microbiota intestinal em indivíduos com obesidade (RODRÍGUEZ et al., 2015; REIMER et al., 2017; NOCE et al., 2019). Assim, o progresso no entendimento da patogenia da obesidade evidencia a delicada integração entre nutrição, sistema imunológico, metabolismo e microbiota.

## **2.2 Microbiota intestinal**

A microbiota intestinal é um sistema orgânico complexo e fundamental para a saúde do hospedeiro. Consiste em trilhões de microrganismos e milhares de espécies bacterianas que têm funções específicas no metabolismo de nutrientes, de xenobióticos e medicamentos do hospedeiro, responsável pela manutenção da integridade estrutural da barreira da mucosa intestinal, imunomodulação e proteção contra patógenos (BRUSAFERRO et al., 2018; MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019).

Estima-se que o trato gastrointestinal de adultos contenha aproximadamente de 500 a 1000 espécies bacterianas distintas (ABENAVOLI et al., 2019). Sendo os filos de bactérias dominantes e responsáveis por 90% da composição da microbiota intestinal humana os Firmicutes e Bacteroidetes. Atualmente, existem mais de 274 gêneros no filo de Firmicutes, que são bactérias gram positivas, incluindo Bacillus, Lactobacillus, Mycoplasma e Clostridium. Já o filo Bacteroidetes inclui aproximadamente 20 gêneros, dos quais o gênero mais abundante no trato gastrointestinal humano é o de Bacteroides (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016; ABENAVOLI et al., 2019).

A associação entre o hospedeiro e sua microbiota (também conhecida como simbiote), fornece um relacionamento benéfico mútuo (DE LEBLANC; LEBLANC, 2014). Esta interação

depende de uma relação homeostática hospedeiro/microbiota que depende de dois fatores: a capacidade intrínseca dos micróbios de colonizar e persistir no hospedeiro e a capacidade do hospedeiro de tolerá-los e controlá-los (ZHANG; JU; ZUO, 2018). Deste modo, a barreira da mucosa intestinal constitui a interface onde ocorre a maioria das interações entre o hospedeiro e a microbiota intestinal (NOBS; ZMORA; ELINAV, 2020).

Diante disto, foi demonstrado que o simbiote não apenas protege o hospedeiro ao competir com patógenos por nutrientes e produzindo fatores antimicrobianos, mas também diminui os distúrbios imunológicos por imunomodulação (MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019). Assim, enquanto o hospedeiro fornece abrigo e nutrientes ao simbiote, este por sua vez, melhora várias funções do organismo, como por exemplo a digestão, para fornecer os nutrientes que são essenciais ao hospedeiro (BÄCKHED et al., 2004; DE LEBLANC; LEBLANC, 2014).

Ainda neste contexto, sabe-se que a comunidade microbiana intestinal é considerada um órgão altamente dinâmico, sensível a insultos ambientais e que modifica sua composição ao longo da vida do hospedeiro. Então, sua estrutura e atividade são influenciadas por múltiplos fatores, que a tornam um sistema único, que varia de indivíduo para indivíduo (NOCE et al., 2019).

Desta forma, os hábitos alimentares são os principais contribuintes para as alterações na diversidade da microbiota, e estas mudanças são detectadas dentro de 24 a 48 horas após a manipulação dietética, e ocorrem independentemente do peso corporal e adiposidade dos indivíduos (GENTILE; WEIR, 2018). Então, o tipo de dieta consumida pode afetar significativamente a expressão gênica e a composição da microbiota intestinal (VALLIANOU et al., 2019).

### **2.3 Relação microbiota intestinal, obesidade e distúrbios metabólicos associados**

Nos últimos anos a microbiota intestinal emergiu como um fator endógeno importante que influencia a obesidade. Estudos apontam que as vias metabólicas do hospedeiro estão inter-relacionadas, e são responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade em animais e humanos. Assim, estudar as interações entre microbiota, dieta e o genótipo do hospedeiro, são atualmente o foco principal das pesquisas da área (DING et al., 2019; SIVAMARUTHI et al., 2019).

Acredita-se que os mecanismos que ligam a microbiota intestinal à obesidade incluem a capacidade de extração de energia dos alimentos, que irão influenciar a integridade da barreira

intestinal, a modulação da inflamação crônica e do sistema imunológico, e a produção de metabólitos específicos, que além de provocarem efeitos locais no sistema imune e na interface intestinal, também sinalizam para outros tecidos e órgãos, incluindo o cérebro, fígado e tecido adiposo (DAO; CLÉMENT, 2018).

Estudos com animais mostraram que a microbiota intestinal está envolvida na regulação da ingestão de alimentos, afetando os hormônios que influenciam a função metabólica e a sinalização em áreas do cérebro associadas ao comportamento alimentar. Esse chamado "eixo intestino-cérebro da microbiota", representa um eixo de sinalização bidirecional que regula o peso corporal e equilíbrio do apetite, e também o armazenamento e gasto de energia (HILDEBRANDT et al., 2009; SCHELE et al., 2013; BOHAN et al., 2019; QUIGLEY, 2019).

BÄCKHED e colaboradores investigaram o papel da microbiota na regulação do metabolismo através de convencionalização, na qual a microbiota de animais criados de forma convencional que tinham a mesma quantidade de gordura corporal, idade e gênero foi transferida para os animais germe-free (GF). Um aumento de 60% no teor de gordura corporal e resistência à insulina em 14 dias de experimento foi observado nos animais GF que receberam a microbiota de animais convencionais, apesar de consumo reduzido de ração. Portanto, estes resultados sugerem que a microbiota intestinal é um importante fator ambiental que afeta a captação de energia da dieta e o armazenamento da mesma no hospedeiro (BÄCKHED et al., 2004). Em adição, foi demonstrado através de transplante da microbiota de camundongos obesos, que ocorreu replicação do fenótipo obeso em camundongos (GF), mostrando que as características da microbiota de animais obesos contribuíram para o ganho ponderal nos animais GF, influenciando positivamente o desenvolvimento da obesidade (TURNBAUGH et al., 2006).

Um dos primeiros trabalhos que vincularam a microbiota intestinal à obesidade em humanos, foi publicado por LEY et al. (2005). Neste trabalho, o autor comparou a microbiota intestinal de indivíduos magros e obesos, revelando que os indivíduos obesos apresentaram uma proporção reduzida do filo *Bacteroidetes* e níveis mais aumentados de *Firmicutes*. Da mesma forma, a riqueza gênica da microbiota também é afetada na obesidade, com estudos mostrando uma redução de 20 a 40% na diversidade das bactérias intestinais ( YOO; KIM, 2016; MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019).

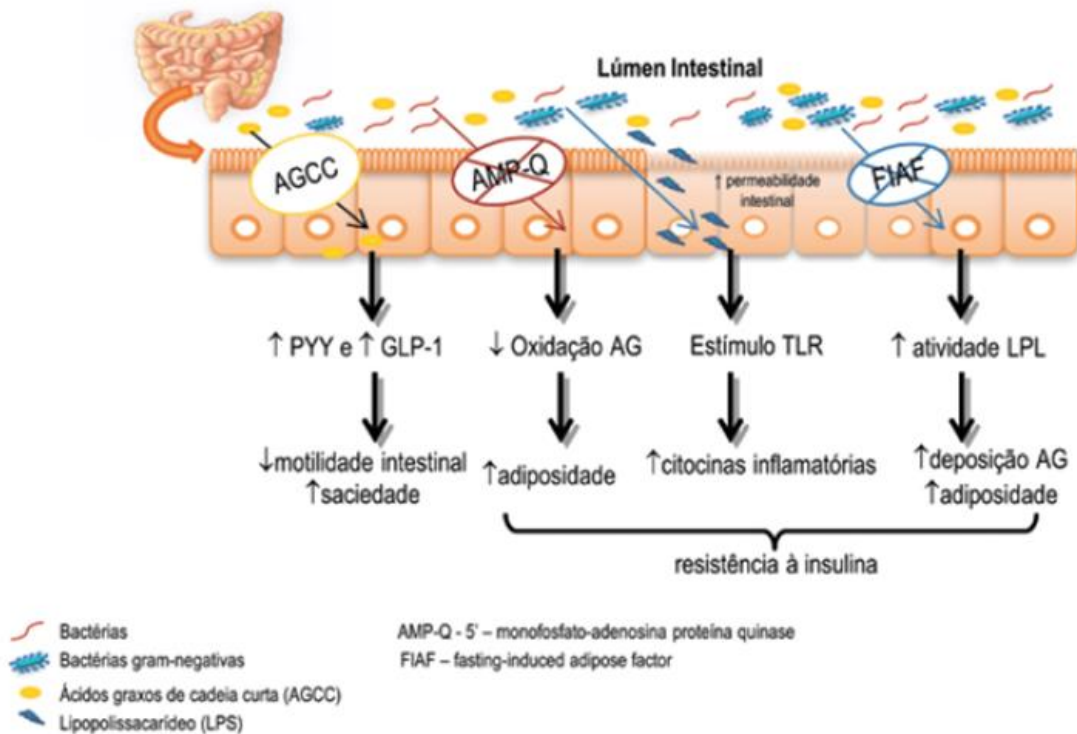
Assim, suspeita-se que a microbiota intestinal de indivíduos com obesidade apresente peculiaridades que possam induzir a inflamação crônica (ANDRADE et al., 2015). Desta forma, um conjunto de evidências têm reconhecido que este estado crônico de inflamação subclínica,

que produz um aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10), favoreça o desenvolvimento de distúrbios metabólicos como a resistência à insulina (RI), considerado evento central para a geração de risco cardiometabólico (DE MORAES et al., 2014; BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016; KOPYLIK et al., 2016; VALLIANOU et al., 2019).

As alterações que ocorrem na composição da microbiota intestinal do hospedeiro podem se apresentar de forma quantitativa e qualitativa, são denominadas "disbiose" ou desequilíbrio da microbiota intestinal. Este quadro tem sido associado ao aparecimento de muitas doenças como obesidade, doenças inflamatórias intestinais, síndrome metabólica, alguns tipos de cânceres, condições auto-imunes e colite por infecção por *Clostridium difficile* (NOCE et al., 2019).

A seguir, estão descritos alguns dos mecanismos mais abordados que envolvem a relação entre a microbiota intestinal e os distúrbios metabólicos, que elevam o risco cardiovascular entre os indivíduos, apesar de não estarem totalmente claros, conforme demonstrado na (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismos envolvidos na relação entre microbiota intestinal e doenças metabólicas.



Fonte: DE MORAES et al. (2014).



### **2.3.1 Fator adiposo induzido pelo jejum - (FIAF)**

O Fator Adiposo Induzido pelo Jejum (FIAF) é um inibidor da enzima lipoproteína lipase (LPL), sendo este produzido no intestino, fígado e tecido adiposo. Níveis elevados de FIAF tem mostrado ser um dos principais mecanismos pelos quais os animais germe-free (GF) são protegidos da obesidade induzida por dieta, sugerindo deste modo, que o FIAF é um mediador que regula o armazenamento de energia no hospedeiro (KOBLYIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEV, 2016).

A diminuição da expressão do FIAF no intestino, que ocorre em consequência do aumento da ingestão de dietas ricas em gorduras saturadas e carboidratos refinados, levam à disbiose intestinal e acarretam um aumento da deposição de triglicerídeos no tecido adiposo. Este fato ocorre pelo aumento da atividade da LPL dos adipócitos, que resulta em aumento da captação de ácidos graxos e armazenamento de gordura nos adipócitos, o que finalmente favorece o desenvolvimento da obesidade e RI entre os indivíduos (SIVAMARUTHI et al., 2019). Observa-se então, que o FIAF serve como um mecanismo de proteção contra a obesidade induzida pela dieta (MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019).

### **2.3.2 Monofosfato - adenosina proteína quinase ativada (AMP-Q)**

O segundo mecanismo proposto envolve a inibição da via da 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q), enzima ativada pela adenosina monofosfato (AMP) que regula o metabolismo energético celular. Quando inibida, essa enzima ativa processos anabólicos e bloqueia processos catabólicos. Deste modo, há evidências de que a AMP-Q desempenhe importante papel na regulação do metabolismo de ácidos graxos e da glicose, assim como na regulação do apetite. Então, a presença da microbiota suprime a expressão da proteína quinase ativada por AMP, que leva a uma diminuição na oxidação de ácidos graxos pelos músculos, e, portanto, favorece a adiposidade corporal e a geração de RI. Contudo, este fato quando comparado a animais GF alimentados com dieta hipercalórica mostraram manter o peso corporal (DE MORAES et al., 2014). Entretanto, o caminho exato pelo qual a microbiota sinaliza para a via AMP-Q no músculo esquelético e fígado não é claro, mas parece ser independente do FIAF (KOBLYIAK; VIRCHENKO; FALALYEYEV, 2016).

### 2.3.3 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)

O terceiro mecanismo descreve a sensibilidade do epitélio intestinal a metabólitos bacterianos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), produtos finais da fermentação bacteriana intestinal de polissacarídeos não digeríveis da dieta. Os AGCCs mais abundantes são o acetato, butirato e propionato, que demonstraram desempenhar um papel importante como substratos no metabolismo glicídico (CERDÓ et al., 2019).

Tem sido mostrado que os AGCCs sinalizam através do sistema nervoso central e influenciam o metabolismo do hospedeiro através da ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPR41 e GPR43) para modular uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a homeostase energética, o metabolismo de lipídios e carboidratos e a supressão de sinais inflamatórios (GENTILE; WEIR, 2018). Então, por influência direta dos AGCCs no metabolismo glicídico, estes induzem a gliconeogênese nos colonócitos e, desta forma, influenciam a secreção do hormônio peptídeo-1 do tipo glucagon (GLP -1), através da ativação dos receptores GPR41 e GPR43 (DAO; CLÉMENT, 2018).

Também foi reportado que os AGCCs ao se ligarem aos receptores à proteína G ativando-os, aumentem a produção do peptídeo YY (PYY), um hormônio que controla o esvaziamento gástrico, e reduz o tempo de trânsito intestinal. Em suma, o aumento da produção de AGCCs, aumenta o peptídeo PYY e o GLP-1, juntamente com uma diminuição da grelina, levando ao aumento da saciedade e à menor ingestão de alimentos, controlando assim o metabolismo energético do hospedeiro (BOHAN et al., 2019; SIVAMARUTHI et al., 2019).

Entretanto, foi demonstrado que indivíduos obesos têm níveis mais aumentados de AGCCs em amostras fecais do que indivíduos magros e isto ocorre, provavelmente, devido às diferenças na fermentação no cólon em indivíduos com obesidade (VALLIANOU et al., 2019). Uma hipótese é que a disbiose microbiana intestinal na obesidade pode levar a uma absorção menos eficiente de AGCCs e, portanto, maior excreção destes. (WANG et al., 2020). No entanto, alguns estudos tem sugerido que os AGCCs contribuem de forma negativa na obesidade, por aumentarem a captação de energia da dieta, por meio de vias incluindo lipogênese de novo e coleta de energia da dieta pela microbiota intestinal, embora isto não tenha sido totalmente demonstrado (DAO; CLÉMENT, 2018; GENTILE; WEIR, 2018; WANG et al., 2020).

### **2.3.4 Lipopolissacarídeos - LPS**

Estudos relatam que uma maior ingestão de gorduras na dieta inibe a expressão das proteínas de junções de oclusão, fazendo com que ocorra aumento da permeabilidade intestinal e consequente vazamento de lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular das bactérias gram-negativas, na circulação. Este quadro denominado de endotoxemia metabólica ativa a respostas imune inflamatória no hospedeiro, promovendo assim, um círculo vicioso que favorece a adipogênese (OTT, et al., 2017; BRUSAFERRO et al., 2018).

A presença do LPS na corrente sanguínea atua ativando o receptor Toll-like 4 (TLR4) e induz desta forma, uma cascata inflamatória (DAO; CLÉMENT, 2018). Deste modo, ocorrem ativações que produzem citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar dano e disfunção endotelial, como por exemplo, o N-óxido de trimetilamina (TMAO), que contribui para o desenvolvimento e progressão das DCVs e detecção precoce de lesão miocárdica (YOO; KIM, 2016).

Tem sido sugerido que indivíduos obesos tendem a ter níveis mais altos de LPS circulante, tanto em condições de jejum ou pós-prandial, estando este fato correlacionado com a obesidade abdominal e controle glicêmico. Estudos em humanos confirmaram que o aumento da exposição crônica ao LPS, foi documentado em promover RI sistêmica e inflamação do tecido adiposo (WHITE, 2016; VALLIANOU et al., 2019).

### **2.4 Impacto da dieta na microbiota intestinal**

A microbiota intestinal exerce um papel importante no metabolismo de nutrientes e também de uma infinidade de compostos bioativos, alguns dos quais modulam vias de sinalização essenciais no intestino e órgãos, e desta forma, governam a homeostase metabólica do hospedeiro (NOBS; ZMORA; ELINAV, 2020).

Tem sido sugerido que a alimentação tenha um efeito direto sobre a composição da microbiota, promovendo mudanças em reações bioquímicas no lúmen intestinal. (DE MORAES, et al., 2014). Desta forma, o alimento se constitui a principal fonte de energia para os micróbios intestinais, e mudanças nos padrões alimentares do hospedeiro podem resultar em rápidas mudanças na estrutura populacional da microbiota (ZHANG; JU; ZUO, 2018).

De fato, as proteínas e carboidratos constituem os principais combustíveis para a fermentação microbiana intestinal. O termo "fibra" é comumente designado para descrever

carboidratos (CHOs) indigeríveis fermentados pela microbiota, embora essa designação seja confusa, dado que algumas fibras não são usadas pela microbiota intestinal (como a celulose), enquanto que outros CHOs prontamente fermentáveis estão fora da definição de fibra (como o amido resistente). Assim, foi proposto recentemente o termo “carboidrato acessível à microbiota,” ou CAM, para descrever os CHOs que estão metabolicamente disponíveis para os micróbios intestinais (GENTILE; WEIR, 2018). Logo, a microbiota intestinal humana depende das fibras dietéticas que provêm dos CAM, para prosperar e fornecer energia aos trilhões de micróbios que a compõem. Neste sentido, a dieta, especificamente o consumo destes tipos de fibras acessíveis à microbiota, parece ser um determinante crítico para a ecologia, diversidade e função da microbiota (ZHANG; JU; ZUO, 2018).

Evidências têm apontado que o consumo de fibras dietéticas, especificamente os CAM, estão associados ao aumento das concentrações dos AGCCs intestinais, que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, e desta forma, auxilia na prevenção e tratamento da obesidade e dos distúrbios metabólicos associados (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016; QUIGLEY, 2019; VALLIANOU et al., 2019).

A proteína tem sido considerada fonte principal de nitrogênio para o crescimento dos microrganismos no cólon, sendo essencial para a assimilação de carboidratos e produção dos AGCCs. Portanto, uma combinação de proteínas e carboidratos no intestino grosso contribui para a saúde intestinal do hospedeiro (ZHANG; JU; ZUO, 2018).

O consumo de uma dieta rica em gorduras saturadas tem suas implicações na obesidade. Estudos têm mostrado que a alta ingestão de gorduras causa alterações na composição da microbiota intestinal, aumentam o conteúdo de LPS e, conseqüentemente, geram a inflamação crônica de baixo grau, condição em que ocorre o aumento de citocinas pró-inflamatórias que alteram a expressão dos genes do hospedeiro e promovem a RI (KOPYLIK et al., 2016; ABENAVOLI et al., 2019; CERDÓ et al., 2019).

Desta forma, o tipo de alimentação presente em dietas ocidentais, caracterizadas por alta ingestão de produtos ricos em gorduras, açúcares e alimentos processados ricos em sódio, e por uma baixa quantidade de fibras dietéticas, impactam diretamente na imunidade inata e no metabolismo dos indivíduos. Ainda, o alto teor de lipídios consumidos nestas dietas, geralmente provêm de ácidos graxos saturados que são comumente encontrados em produtos de origem animal, como laticínios de leite integral e carnes gordurosas (NOBS; ZMORA; ELINAV, 2020). Um estudo explorando as diferenças das variáveis inflamatórias do hospedeiro em

relação à microbiota intestinal, em função de três grupos alimentares distintos, em indivíduos com sobrepeso/obesidade mostrou que indivíduos com um padrão alimentar mais saudável (maior consumo de frutas, iogurtes e sopas e menor consumo de açúcares, doces e bebidas adoçadas), apresentaram menor comprometimento metabólico e maior riqueza e diversidade encontrada na microbiota, apesar de não haver diferenças na ingestão total de energia ou no peso corporal entre os grupos (KOBLYIAK et al., 2016).

Ainda neste contexto, a ingestão excessiva de sódio que frequentemente está associada ao alto risco de doenças cardiovasculares, estando o cloreto de sódio prontamente disponível em alimentos processados e ingerido em grandes quantidades como parte das dietas ocidentais. Um estudo em que animais receberam uma dieta controle ou suplementada com 4% de cloreto de sódio, mostrou nos resultados que as mudanças provocadas na microbiota intestinal pelo consumo de uma dieta rica em sódio, agiram induzindo a inflamação intestinal e exacerbação da colite em camundongos (AGUIAR et al., 2018). Outro tratamento em camundongos que receberam *Lactobacillus murinus*, mostrou prevenir a hipertensão induzida por sódio, indicando que a microbiota intestinal pode ser um potencial alvo terapêutico para doenças associadas ao sódio (WANG et al., 2020).

Assim, as pessoas que vivem em ambientes mais industrializados, tendem a ter menor diversidade microbiana do que as pessoas que vivem de maneira mais tradicional, ou seja, sem as modernidades atuais (DAO; CLÉMENT, 2018). Desta forma, a modulação da microbiota por meio da dieta talvez seja a forma mais simples, fisiológica, eficaz e de fácil adesão para se obter modificações positivas na obesidade e diminuir o risco cardiometabólico na população (DE MORAES et al., 2014).

## **2.5 Probióticos e obesidade**

O termo “probiótico” originou-se da palavra grega que significa “para a vida”. Fuller em 1989, definiu o termo probiótico como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando seu equilíbrio intestinal” (YOO; KIM, 2016). No entanto, para a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2006).

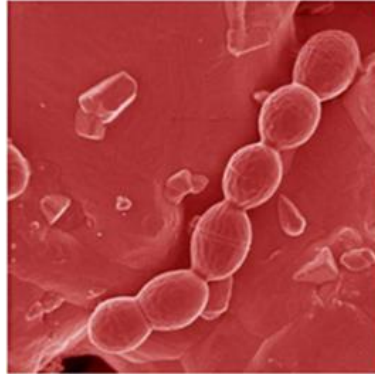
Deste modo, cepas probióticas específicas têm sido cada vez mais estudadas por seus potenciais terapêuticos em modelar a composição da microbiota intestinal e, em consequência,

promover possíveis benefícios no controle do peso e também no gerenciamento do diabetes (LAU et al, 2019). No entanto, os efeitos benéficos dos probióticos parecem ser específicos da cepa; assim, diferentes cepas da mesma espécie podem exercer efeitos distintos (VALLIANOU et al., 2019).

Estudos pré-clínicos que utilizaram diferentes cepas bacterianas em modelos animais, sugeriram propriedade anti-obesidade dos probióticos. A modulação da homeostase energética (pela redução na taxa de eficiência alimentar) e efeitos anti-inflamatórios / antioxidantes parecem estar subjacentes às propriedades benéficas dos probióticos (KOBLYIAK et al., 2016).

Neste sentido, estudos realizados com probióticos em animais e humanos confirmaram que seu uso pode ter efeito benéfico em várias doenças, como a melhora dos distúrbios metabólicos do DM2 e DCVs, que por sua vez levam à estimulação da sinalização insulínica, e na redução do colesterol (YOO; KIM, 2016; ZHANG; JU; ZUO, 2018; LAU et al., 2019). Ainda neste contexto, os probióticos também mostraram exercer um efeito potencial anti-hipertensivo por meio da melhora do perfil lipídico, da sinalização insulínica e de outras vias metabólicas, e seu uso tem sido reportado como estratégia nutricional na prevenção e no tratamento do diabetes, afim de reduzir os riscos de desenvolvimento de hipertensão arterial nestes pacientes. Uma meta-análise sugeriu uma ação benéfica dos probióticos sobre alguns fatores de risco cardiometabólicos em indivíduos com DM2. O estudo sugere uma redução dos níveis séricos de proteína-C reativa, de CT, de TG e de LDL-c, da pressão arterial sistêmica e da frequência cardíaca (BEZERRA et al., 2016). BERNINI e colaboradores (2016) realizaram um estudo com pacientes portadores de síndrome metabólica no qual a suplementação com leite fermentado contendo *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) foi feita por 45 dias. Neste estudo, os participantes foram instruídos a manterem suas dietas habituais, nível de atividade física ou outros fatores do estilo de vida durante todo o período de intervenção. Os resultados mostraram efeitos potenciais do probiótico *B. lactis* no controle da obesidade, dos lipídios sanguíneos e alguns marcadores inflamatórios, o que pode vir a reduzir o risco cardiovascular em pacientes com SM.

A cepa (LMG 27352) espécie *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) (figura 2), é uma espécie de bactéria láctica homofermentativa, que produz ácido láctico apenas a partir de açúcares. Essa espécie tem sido amplamente utilizada na produção de leiteiro, queijo e outros produtos, em razão de sua produção de várias bacteriocinas como *nisina*, *lactococcina* e *diacetina*. Com base em sua atividade antibacteriana, a cepa (LMG 27352) também foi investigada como um inibidor de outras bactérias (NISHIYAMA et al., 2018)

Figura 2 - *Lactococcus lactis*

Fonte: “Disponível: [https://web.mst.edu/~microbio/BIO221\\_2009\\_lactis.ht](https://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009_lactis.ht) Acesso em: 20 nov 2020. “

Estudos relataram que algumas bactérias do ácido lático liberam peptídeos com potencial anti-hipertensivo durante o processo de fermentação do leite (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Este fato ocorre por ação destes peptídeos ao inibirem a enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a formação de angiotensina II, um potente vasoconstritor (BELTRÁN-BARRIENTOS et al., 2018).

Desta forma, estudos confirmaram que a partir de condições de fermentação as cepas de *L. lactis*, que possuem atividade proteolítica, foram capazes de liberar vários novos peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) em leites fermentados (RODRÍGUEZ-FIGUEROA et al., 2010, 2012). Em adição, este mesmo grupo, demonstrou que as frações de soro de leites fermentados com *L. lactis*, reduziram a pressão arterial sistólica e diastólica, a frequência cardíaca, e teve efeito hipolipidêmico em ratos levemente hipertensos, por três semanas de intervenção (RODRÍGUEZ-FIGUEROA et al., 2013).

Outro trabalho em modelo animal, apontou que a administração oral do probiótico *L. lactis*, por quatro dias consecutivos, modulou a resposta imunológica levando a uma redução da inflamação e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias em camundongos (REZENDE et al., 2013).

No entanto, poucos trabalhos com humanos foram realizados com esta cepa (LMG 27352) de forma isolada, estando na maioria das vezes combinada com outras extirpes bacterianas. Um ensaio clínico avaliando os efeitos do leite fermentado contendo somente a cepa *L. lactis* sobre os parâmetros pressóricos em 36 indivíduos pré-hipertensos durante oito semanas, revelou que em cinco semanas de tratamento a pressão arterial sistólica e diastólica do grupo suplementado foram menores que as do grupo controle. Além disso, os níveis de TG, CT e LDL-c também foram menores no grupo tratado em relação ao placebo. Deste modo, o leite fermentado com *L. lactis* atenuou a pressão arterial e melhorou os níveis de colesterol em

indivíduos pré-hipertensos, confirmando seus achados anteriores em animais (BELTRÁN-BARRIENTOS et al., 2018).

Ainda com o objetivo de esclarecer os efeitos da cepa *L. lactis*, foi realizado um estudo duplo-cego e controlado, com um iogurte fermentado com as cepas *L. lactis* e *B. lactis*, que analisou os parâmetros da síndrome metabólica e de imunidade, em 76 voluntários durante oito semanas. Entre os itens testados, o LDL-c diminuiu significativamente, o que consequentemente diminuiu o valor do CT e a relação LDL / HDL-c. Por outro lado, a suplementação única da cepa *B. lactis* ou combinada com a cepa *Lactobacillus acidophilus* não mostrou qualquer efeito hipocolesterolêmico em dois ensaios clínicos randomizados de controle anteriormente. Portanto, acredita-se que os efeitos observados neste estudo tenham sido causados pela cepa *L. lactis* sozinha ou sua combinação com a cepa *B. lactis* (NISHIYAMA et al., 2018).

Assim, uma base de evidências vem crescendo e apoiando cada vez mais o uso de probióticos devido à variedade de benefícios que tem proporcionado à saúde. Mais de 25 doenças ou condições de saúde já foram associadas à microbiota intestinal, indo muito além da saúde gastrointestinal, como as doenças auto-imunes, saúde emocional, e também nas estratégias de tratamento da obesidade. No entanto, sabe-se que os efeitos clínicos dos probióticos dependem de muitos fatores, incluindo as espécies e a cepa do probiótico, em que cepas diferentes da mesma espécie podem produzir resultados clínicos heterogêneos (PARKER et al., 2018).

Nesse sentido, os esforços relacionados a recomendação de probióticos devem se concentrar na identificação de novas linhagens, como possíveis terapias da obesidade, incluindo i) aprimoramento das estratégias de produção de probióticos, ii) conhecimento detalhado das interações entre microbiota intestinal e probiótico-hospedeiro, iii) padronização, tanto quanto possível, da dosagem probiótica e duração do tratamento, iv) considerar efeitos físicos potenciais de cada indivíduo (idade, sexo e origem genética) na eficácia do tratamento (CERDÓ et al., 2019).

Diante do exposto, o presente projeto visou estudar os efeitos terapêuticos e moduladores da cepa probiótica (LMG 27352) *Lactococcus lactis*, sobre as alterações cardiometabólicas em indivíduos com obesidade.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Protocolo e população de estudo

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, prospectivo, com cegamento triplo e controlado por placebo. O protocolo foi desenvolvido com os pacientes do CEM (Centro de Especialidades Médicas) do município de Três Corações-MG, no setor de nutrição deste ambulatório. O recrutamento ocorreu entre novembro e dezembro de 2019, e as visitas clínicas aconteceram de janeiro a maio de 2020 (período que atingiu o isolamento social da pandemia de COVID-19). A divulgação do estudo aconteceu por meio de cartazes afixados em locais de fácil acesso do CEM, bem como da abordagem de pacientes que aguardavam para o atendimento médico.

Os pacientes que concordaram em participar do estudo e se enquadraram nos critérios de inclusão, deram seu consentimento por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), posteriormente, foram orientados a respeito de seus direitos, riscos e benefícios.

O presente estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Lavras sob o parecer de nº 3.663.305.

Os participantes foram primeiramente pareados por sexo e IMC e randomizados usando um gerador de números aleatórios computadorizado, e alocados em dois grupos: i) placebo (controle) ou ii) suplementado (tratamento). Um pesquisador independente alocou os números de randomização e forneceu a lista de randomização aos responsáveis pela manipulação das cápsulas. Estavam cegos todos os participantes, o pesquisador e também o responsável pelas análises estatísticas, em que o código de cegamento foi fornecido aos investigadores somente após a conclusão das análises estatísticas.

Antes do início da suplementação, os participantes foram avaliados na primeira visita (linha de base), em que foram coletadas as medidas antropométricas, feita a avaliação da composição corporal (Bioimpedância elétrica), aplicado o recordatório alimentar de 24 horas, e também realizada a coleta das amostras bioquímicas.

### 3.2 Assuntos

A adesão ao tratamento foi avaliada por meio das visitas agendadas regularmente a cada 15 dias e pela contagem de cápsulas devolvidas nos frascos. Também foi criado um grupo por meio das redes sociais (WhatsApp) para facilitar a comunicação do pesquisador com os voluntários, onde os mesmos eram lembrados das datas de visitas e avaliações, dos exames, da devolução dos frascos, esclarecimento de dúvidas pertinentes, e ainda, para lembrá-los da tomada diária do probiótico. Todos os participantes foram convidados a participar de uma palestra no início do protocolo, que foram abordados os seguintes tópicos: a importância da microbiota intestinal na saúde e/ ou doença, e os benefícios de um modo geral do uso de probióticos.

Para a seleção dos participantes foram adotados os seguintes critérios:

(i) Critérios de inclusão: ter idade  $\geq 20$  e  $\leq 60$  anos, Índice de Massa Corporal (IMC) de 30,0 a 39,9 Kg/m<sup>2</sup> (WHO, 1995), e apresentar circunferência da cintura elevada sendo:  $> 102$  cm para homens e  $> 88$  cm para mulheres (WHO, 1998), e ainda, deveriam apresentar algum tipo de alteração metabólica associada à obesidade como: pressão arterial  $> 130$  mmHg (sistólica) ou  $> 85$  mmHg (diastólica), ou em tratamento com droga anti-hipertensiva em um paciente com histórico de hipertensão; triglicerídeos  $> 150$  mg/dL, ou no tratamento medicamentoso para triglicerídeos elevados; HDL-c  $< 40$  mg / dL para homens, e  $< 50$  mg / dL para mulheres, ou em uso de medicamento para níveis baixos de HDL-c; Glicemia  $> 100$  mg/dL, ou em tratamento com fármacos para hiperglicemia (GRUNDY et al., 2004). Também deveriam aceitar o TCLE e ser capaz de seguir o protocolo do estudo para participarem.

(ii) Critérios de não inclusão: IMC  $\geq 40,0$  kg/m<sup>2</sup>, e uso de grandes doses de probióticos comerciais consumidos nos últimos 06 meses ( $\geq 10^8$  UFC- unidades formadoras de colônia/dia), que se inclui comprimidos, cápsulas, pastilhas, gomas de mascar ou pó nos quais o probiótico é um componente primário (o uso deveria ser descontinuado e evitado por um mês antes do início do estudo). O consumo dietético de alimentos fermentados como leites, bebidas ou iogurtes não se aplicaram nos critérios de não inclusão dos participantes.

### 3.3 Suplementação probiótica nos grupos

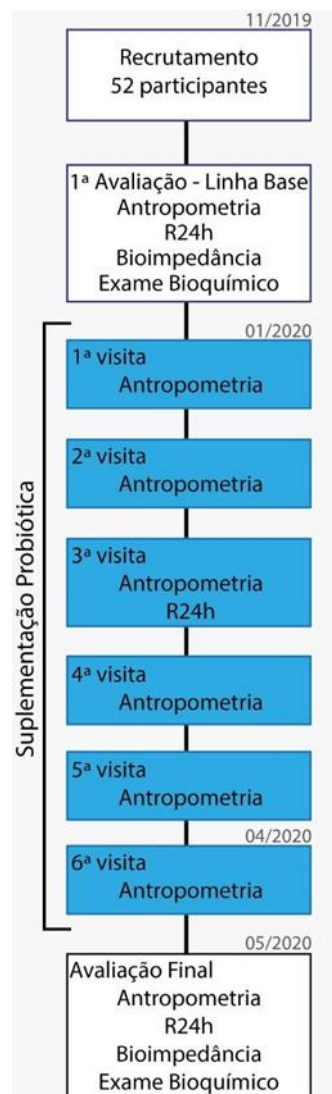
A amostra total foi de 52 voluntários, os eleitos após a randomização receberam: (i) placebo - cápsulas com 20mg de celulose (n = 26) e (ii) probiótico - cápsulas com 20 mg com a cepa probiótica (LMG 27352), espécie *Lactococcus lactis* a uma concentração de  $2 \times 10^9$  UFC/dia (n = 26).

A cepa probiótica foi cedida pela empresa Coana Importação e Exportação Ltda - Florianópolis-SC, sendo a manipulação das cápsulas realizada pela farmácia Néctar-Três Corações-MG, em que os microrganismos (cepa probiótica) estavam na forma liofilizados, e juntamente com o placebo foram submetidos ao encapsulamento na forma vegetal, de modo que ambas as cápsulas se apresentaram de maneira idêntica.

Os participantes foram instruídos a ingerir uma cápsula diariamente do probiótico ou placebo antes do café da manhã, e a manter suas dietas usuais, nível de atividade física ou outros fatores de estilo de vida habituais ao longo do período de intervenção. Também foram orientados que não seria necessário acondicionar os frascos da suplementação em geladeira, no entanto, deveriam evitar guardá-los em locais abafados ou sob a incidência direta do calor.

Os voluntários receberam tratamento pelo período total de 90 dias, e foram solicitados a retornar ao CEM quinzenalmente para receber as cápsulas e devolução dos frascos já consumidos, e durante as visitas todos foram reavaliados quanto à antropometria, conforme apresentado na (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma das avaliações.



Fonte: Da autora (2021).

### 3.4 Análise antropométrica, de composição corporal e consumo alimentar

A avaliação antropométrica foi realizada no início (linha de base), e durante as visitas da intervenção. Foram adotados os seguintes métodos nas aferições: peso (Kg), estatura (cm), cálculo do IMC ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ), circunferência de cintura (CC) e circunferência de quadril (CQ), ambas em centímetros. Para obtenção do peso e estatura foi utilizada a balança digital modelo (New Balmak BK), com capacidade para 200 kg com estadiômetro acoplado. O peso foi aferido com os voluntários no centro do equipamento, com uso de roupas leves e descalços, eretos, e com pés juntos e braços estendidos ao longo do corpo. A altura foi medida sem sapatos e com a cabeça livre de adereços, no centro do equipamento, com indivíduos eretos e com braços estendidos ao longo do corpo, e com a cabeça erguida, olhando para frente. A CC foi medida na linha natural da cintura, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, e a CQ medida pelo maior perímetro entre a cintura e a coxa, com os voluntários usando roupas finas. Para aferir a circunferência da cintura e quadril foi utilizada uma fita inelástica (BRASIL, 2011).

A composição corporal foi analisada por bioimpedância elétrica (BIA), modelo BIODYNAMICS 310 (versão 8.01), em que foi mensurada a massa magra (Kg) e adiposa (massa gorda) em Kg e percentual, e o volume total de água corporal dos voluntários no momento inicial e ao final da intervenção.

Conforme as orientações do fabricante do equipamento utilizado para a avaliação por BIA, os voluntários foram orientados a seguir um protocolo no dia anterior ao exame, sendo necessário:

- Ingestão de 1,5 a 2 litros de água no dia anterior ao teste;
- Não realizar exercícios físicos nas 24h antecedentes;
- Não ingerir álcool e alimentos cafeinados (café, chá, chocolate) 24h antes;
- Estar em jejum de 4h.

O consumo alimentar foi avaliado por meio da aplicação de recordatório alimentar de 24hs que foi aplicado nos seguintes momentos: (i) início, (ii) 45 dias e (iii) ao final da intervenção.

Nos recordatórios alimentares, foram registrados todos os tipos de alimentos consumidos pelos participantes na véspera da avaliação. Os voluntários foram orientados a relatar seu consumo em medidas caseiras e ao final de cada coleta, foi conferido junto aos mesmos, se as informações registradas estavam corretas. Após a coleta dos dados, foi realizada uma padronização dos recordatórios, na qual os alimentos foram convertidos em gramas e

mililitros para as análises, baseado na Tabela para Avaliação do Consumo em Medidas Caseiras (PINHEIRO et al., 2008), e na Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil (IBGE, 2011), e seguindo as orientações do Manual de Críticas de Inquéritos Alimentares (CASTRO, 2013), em que foi adotado:

- Adicionar a todos os recordatórios uma colher sopa (8grs.) de óleo de soja, para cada refeição (almoço e jantar);
- Adicionar um fio de azeite de oliva (0,5 mL), e uma pitada de sal (0,35 grs.), em saladas cruas quando não especificado os temperos utilizados;
- Para os legumes foi considerado como cozido quando não especificado a forma de preparo.

A composição nutricional da dieta foi avaliada pelo *Software* Dietpro clínico versão 5.1, que quantificou o consumo energético, dos macronutrientes e fibras presentes na dieta dos voluntários.

### 3.5 Análises bioquímicas

Os participantes foram submetidos a análises laboratoriais na linha de base, e 90 dias após os tratamentos. As amostras de sangue foram coletadas pela manhã, após jejum noturno de 12 horas, no laboratório público (prefeitura municipal) ou particulares da cidade. O custeio dos exames realizados em rede particular foi financiado pelos próprios voluntários que fizeram esta opção.

Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: hemograma completo, glicose, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c), triacilgliceróis (TGs), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), hemoglobina glicada, insulina e realizado o cálculo do Homa-IR utilizando-se a equação 1, conforme descrito por MATTHEWS et al. (1985).

$$\text{Homa- IR} = \text{Glicose jejum (mmol/L)} \times \text{Insulina jejum (uU/mL)} \div 22,5 \quad (1)$$

### 3.6 Cálculo amostral e métodos estatísticos

O cálculo amostral foi realizado de acordo com trabalhos similares, adotando-se um nível de significância de 5%, poder estatístico de 0,8 e tamanho do efeito mediano de 0,4 (BERNINI et al., 2016). Foi necessário o recrutamento de uma amostra total de 52 indivíduos, sendo 26 por grupo. Os participantes foram divididos em grupo controle (n = 26) e grupo tratamento (n = 26).

Inicialmente todos dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel (Microsoft, EUA). Em sequência, a normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, em que as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas em logaritmo (Log10) para realização das análises.

Para comparar as diferenças entre os grupos no momento inicial foi utilizado o teste T de *Student* para amostras independentes. Foi utilizado o teste Anova para medidas repetidas por GLM, para identificação de efeitos da intervenção proposta. Os dados foram apresentados em valores de média  $\pm$  desvio padrão (DP).

De acordo com as características do GLM, foram comparadas as médias de cada grupo com ele mesmo em momentos distintos (inicial e final), análise intragrupo. De forma complementar, foram realizadas comparações entre os diferentes grupos (controle e tratado) nos momentos distintos (inicial e final), análise intergrupos. Desta maneira, mostrando um aumento na possibilidade de encontrar variações da interação entre Tempo x Grupo (T x G), considerados efeitos estatisticamente significativos da intervenção.

Para as análises foi utilizado o *software* SPSS (versão 20.0), com adoção do nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes estatísticos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostra

Foram incluídos 52 participantes no estudo, sendo 41 do sexo feminino (78,8 %) e 11 do masculino (21,2%), e após a randomização dos grupos, 26 participantes receberam o tratamento com *L. lactis* e os outros 26 receberam o placebo, sendo que cinco indivíduos desistiram em decorrência das restrições impostas pela pandemia de COVID 19.

A Tabela 1 mostra as características dos participantes no momento inicial do estudo (t0). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a idade e características antropométricas como o peso corporal, IMC e circunferências de cintura e quadril.

Tabela 1 - Características iniciais dos grupos tratado e controle.

<b>Variável</b>	<b>Todos</b>	<b>Grupo: Tratado</b>	<b>Grupo: Controle</b>	<b>p</b>
		<b>(média ± DP)</b>	<b>(média ± DP)</b>	
Idade	45,4±8,2	44,6±8,8	46,1±7,6	0,513
Peso (Kg)	90,2±12,4	89,4±12,4	91,1±12,6	0,611
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	34,2±2,7	34,2±2,8	34,1±2,7	0,942
CC (cm)	107,5±9,0	106,5±9,7	108,6±8,3	0,391
CQ (cm)	116,4±7,7	117,3±9,05	115,6±6,2	0,426

Valores apresentados em média ± DP: IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CQ= circunferência do quadril.

Teste T de *Student* para amostras independentes. \*(p<0,05).

Fonte: Da autora (2021).

### 4.2 Variáveis antropométricas

A Tabela 2 apresenta o efeito da intervenção sobre as variáveis antropométricas estudadas.

Foi observado um efeito aleatório para a variável circunferência de cintura (p<0,05) ao longo do tempo, ou seja, sem efeitos da intervenção, que é somente a interação entre Tempo x Grupos (T x G). Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para as demais variáveis analisadas.



Tabela 2 - Variáveis antropométricas dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado		Grupo: Controle		Tempo	p	
	Inicial	Final	Inicial	Final		Grupo	T x G
Peso (kg)	89,4±12,4	89,6±11,8	91,1±12,6	85,2±12,3	0,333	0,735	0,132
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	34,2±2,8	34,3±2,7	34,1±2,7	33,8±2,7	0,407	0,688	0,132
CC (cm)	106,5±9,7	105,9±8,6	108,6±8,3	106,9±6,8	0,025*	0,452	0,480
CQ (cm)	117,3±9,0	117,6±8,3	115,6±6,2	114,5±7,3	0,395	0,262	0,175

Valores apresentados em média ± DP: IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CQ= circunferência do quadril. Anova para medidas repetidas, GLM.

T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

Fonte: Da autora (2021).

### 4.3 Composição corporal

A avaliação da composição corporal foi realizada por método de bioimpedância elétrica (BIODYNAMICS 310), com a qual obtivemos medidas de massa livre de gordura (Kg), massa gorda (kg e %) e volume de água corporal total.

Foi observado um efeito do tempo sobre as variáveis de MM (kg) e água na massa magra (AMM). Para as demais variáveis não foram encontrados resultados estatisticamente significativos da intervenção (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição corporal dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado		Grupo: Controle		Tempo	p	
	Inicial	Final	Inicial	Final		Grupo	T x G
Bioresistência	483,1 ±62,2	485,9 ±106,6	474,4 ±64,9	489,4 ±71,5	0,775	0,716	0,363
Reactância	59,3 ±6,9	58,6 ±7,4	57,7 ±8,7	58,4 ±9,2	0,331	0,283	0,366
MM (kg)	55,9 ±9,8	55,0 ±8,3	57,4± 10,1	57,0 ±10,6	0,031*	0,519	0,539
MG (Kg)	33,4 ±6,5	34,0 ±6,3	33,6 ±5,4	33,1 ±5,5	0,863	0,903	0,122
MG (%)	37,46 ±5,19	38,25 ±4,91	37,10 ±4,61	36,97 ±5,39	0,340	0,581	0,088
ACT (L)	40,60 ±8,15	39,69 ±6,50	41,98 ±8,71	41,78 ±9,06	0,116	0,448	0,443
AMM	72,00 ±2,60	71,83 ±2,42	72,00 ±2,60	72,53 ±2,76	0,00*	0,338	0,334

Valores apresentados em média ± DP: MM= Massa Magra; MG= Massa Gorda, ACT= Água Corporal Total e AMM= Água na Massa Magra.

Anova para medidas repetidas, GLM. T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

Fonte: Da autora (2021).

#### 4.4 Parâmetros bioquímicos

Os resultados encontrados das análises bioquímicas estão descritos na Tabela 4. Foi observado um efeito aleatório, nas variáveis de perfil lipídico (CT, VLDL-c) e para a variável hemodinâmica RDW, apenas em função do tempo, ou seja, sem relação com a intervenção proposta.

A análise também mostrou um efeito do grupo (independente do tempo) sobre as variáveis de perfil glicêmico como glicose e hemoglobina glicada (HbA1c), e no marcador de resistência à insulina (Homa-IR), todos maiores no grupo tratamento em relação ao grupo placebo nos dois momentos.

Também foi observado o mesmo efeito na variável Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO), um marcador da função hepática, sendo maior no grupo tratamento em ambos os momentos.

A única variável em que foram observados efeitos estatisticamente significativos da intervenção (interação tempo *vs* grupo), foi para Triacilgliceróis plasmáticos (TG). O teste de post-hoc demonstrou que houve um aumento dos TG no grupo tratado com o probiótico.

Tabela 4 - Variáveis bioquímicas dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado		Grupo: Controle		Tempo	p	T x G
	Inicial	Final	Inicial	Final			
Glicose	116,9±69,8	111,6±36,9	92,1±14,8	96,3±19,9	0,468	0,060	0,593
HbA1c	6,3±1,9	6,22±1,4	5,65±0,5	5,5±0,5	0,465	0,058	0,665
Insulina	12,5±7,9	11,9±5,9	11,1±6,3	9,7±6,0	0,649	0,211	0,252
Homa-IR	3,5±2,6	3,25±1,8	2,5±1,5	2,3±1,4	0,893	0,048*	0,411
CT	194,3±52,6	205,1±44,2	188,9±29,4	195,7±34,4	0,046*	0,767	0,324
TG	135,4±104,5	164,1±83,9	138,7±69,5	127,5±83,8	0,449	0,189	<b>0,010*</b>
LDL-c	111,9±39,4	120,4±34,0	106,1±29,0	107,2±31,9	0,149	0,364	0,122
HDL-c	57,3±10,9	54,0±10,2	57,1±14,7	59,1±16,0	0,570	0,413	0,145
VLDL-c	24,2±12,6	30,7±15,0	25,8±11,4	29,3±12,7	0,000*	0,827	0,129
HM	4,6±0,4	4,8±0,61	4,8±0,6	27,8±62,6	0,065	0,064	0,069
HB	13,0±1,3	13,4±1,6	13,2±1,5	13,3±1,8	0,076	0,859	0,061
HT	39,0±5,9	41,1±4,5	40,5±3,9	40,7±5,0	0,152	0,558	0,110
VCM	87,1±4,8	86,2±5,6	84,1±8,1	83,4±8,8	0,075	0,124	0,977
HCM	28,3±2,1	28,1±2,0	27,3±2,9	27,3±3,3	0,294	0,224	0,778
CHCM	32,5±1,3	32,6±0,8	32,6±1,5	32,6±1,1	0,604	0,896	0,749
RDW	13,0±1,0	13,6±1,3	14,0±0,02	11,8±5,3	0,000*	0,085	0,084
Leucócitos	6218,5± 1568,3	6785,8± 1754,5	6438,5± 1396,6	6510,8± 1700,5	0,073	0,927	0,196
Plaquetas	255384,6 ±69131,2	266153,8 ±78090,5	246576,9 ±64573,8	245800,0 ±69382,4	0,434	0,439	0,378
TGO	24,9±10,5	22,8±7,2	19,3±5,5	19,7±6,9	0,590	0,012*	0,343
TGP	22,5±11,8	21,7±11,1	18,9±8,6	17,5±6,6	0,261	0,140	0,707
GGT	33,7±28,1	30,8±12,3	31,3±12,6	31,5±15,7	0,989	0,930	0,870

Valores apresentados em média ± DP: HbA1c = hemoglobina glicada; CT = colesterol total; TG = triglicerídeos; LDL-c = colesterol de lipoproteína de baixa densidade; HDL-c= colesterol de lipoproteína de alta densidade; VLDL-c= lipoproteína de muita baixa densidade, HM= hemácias; HB= hemoglobina;

HT= hematócrito; VCM= valor corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW= amplitude de distribuição dos eritrócitos; TGO= Transaminase Hepática Oxalacética; TGP= alanina aminotransferase; GGT= gama glutamil transferase. Anova para medidas repetidas, GLM.

T x G (interação tempo x grupo) \*( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2021).

#### **4.5 Consumo alimentar**

Durante todo o estudo, houve acompanhamento e avaliação do consumo alimentar dos participantes com o objetivo de investigar uma possível interferência da alimentação nos resultados. A análise foi feita por meio da aplicação de recordatório alimentar de 24h que foi realizado em três momentos, sendo: (i) no início, (ii) 45 dias e (iii) ao final do protocolo.

O valor calórico consumido pelos dois grupos foi semelhante durante todo o período de estudo. Em relação à ingestão dos macronutrientes, foi observado um aumento no consumo de carboidratos (CHOS) ao longo da intervenção, em ambos os grupos (Tabela 5).

Também observamos em nossos resultados que a dieta dos voluntários estava hiperprotéica no momento inicial do estudo. As análises demonstraram que ocorreu uma redução no consumo de proteínas entre os grupos ao longo do tempo da suplementação.

Em relação a ingestão de gorduras, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados.

Já o eletrólito sódio (Na), apresentou resultado estatisticamente significativo, os resultados mostraram um aumento no consumo do mesmo no grupo suplementado e redução ao final no grupo placebo.

Em relação à quantidade de fibras consumidas pelos grupos, os resultados não mostraram diferenças significativas, porém, estavam bem abaixo das necessidades diárias em ambos os grupos, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Consumo alimentar dos grupos tratado e controle antes, durante e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado			Grupo: Controle			Tempo	p	T x G
	Início	Meio	Final	Início	Meio	Final			
Kcal	1488,4 ±577,6	1555,9 ±709,8	1517,1 ±454,6	1528,8 ±620,2	1488,8 ±433,1	1297,1 ±489,9	0,276	0,464	0,164
PTN (g)	165,5 ±81,0	94,0 ±63,3	76,9 ±41,6	152,2 ±84,3	115,6 ±54,6	68,7 ±41,5	0,000*	0,423	0,844
CHO (g)	66,7 ±44,6	141,9 ±94,7	165,3 ±80,9	88,3 ±56,8	116,1 ±75,3	142,4 ±75,1	0,000*	0,709	<b>0,048</b> *
LP (g)	67,2 ±30,1	63,9 ±28,0	69,3 ±35,7	61,7 ±24,6	61,7 ±24,0	51,2 ±21,5	0,420	0,066	0,229
Na (mg)	1485,7 ±830,9	1509,1± 1026,1	2095,6± 1454,2	1621,7 ±867,8	1672,9 ±821,8	1359,3 ±834,4	0,710	0,296	<b>0,011</b> *
Fibras (g)	11,8 ±5,9	17,0 ±10,6	16,0 ±7,5	13,3 ±8,4	15,5 ±6,6	13,2 ±8,73	0,134	0,695	0,111

Valores apresentados em média ± DP: Kcal= quilocalorias; PTN= proteína; CHO= carboidratos, LP= Lipídios; Na= sódio. Anova para medidas repetidas, GLM.

T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

Fonte: Da autora (2021).

## 5 DISCUSSÃO

O presente projeto teve por objetivo estudar os possíveis efeitos da administração da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) sobre parâmetros de risco cardiometabólicos associadas à obesidade. A hipótese partiu de estudos em modelos animais que mostraram efeitos antiinflamatórios pelo uso de *Lactococcus lactis* (GOMES-SANTOS et al., 2012; BERNINI et al., 2016). A cepa *L. Lactis* já foi utilizada em alguns trabalhos, em modelos animais e humanos, na forma isolada ou combinada a outras cepas e por diferentes tempos de intervenção (REZENDE et al., 2013; FABERSANI et al., 2019, GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2020).

Destacamos que o presente estudo foi o primeiro a utilizar a cepa probiótica *Lactococcus Lactis* (LMG 27352), na dosagem de  $2 \times 10^9$  UFC/dia, na forma isolada em humanos. Neste trabalho, avaliamos variáveis antropométricas, de composição corporal e também os parâmetros bioquímicos relacionados ao risco cardiovascular em indivíduos obesos. Conforme determinação da legislação brasileira, é recomendado que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  e  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Desta forma, a suplementação com *L. lactis* na dosagem de  $2 \times 10^9$  UFC/dia, atendeu as recomendações da quantidade mínima sugerida para obtenção dos benefícios com probióticos. Nosso grupo optou por não utilizar dosagens ainda maiores, por receio de vir a comprometer a tolerância intestinal dos voluntários. Ainda, priorizamos por desenvolver nosso estudo por 12 semanas, que comparado a outros que fizeram em tempo menor, como garantia de que a suplementação por um tempo maior promoveria resultados positivos.

Sabe-se que microbiota intestinal produz moléculas ativas de sinalização que interagem com o metabolismo do hospedeiro. (NEVES et al., 2015). Tem sido sugerido que este mecanismo ocorra através da fermentação das fibras pela microbiota e consequente produção dos AGCCs, que interagem com os receptores acoplados à proteína G, e afetam a sensibilidade à insulina em adipócitos e órgãos periféricos, regulando assim o metabolismo energético (GOMES et al., 2017). Portanto, tem sido relatado que uma possível melhora na composição corporal devido à administração de probióticos, pode ocorrer em consequência da supressão do FIAF no intestino, o que modula a produção de AGCCs regulando o metabolismo energético do hospedeiro (BÄCKHED et al., 2004).

Os resultados do presente estudo mostraram que a suplementação com *L. lactis* não teve efeito sobre as variáveis antropométricas e parâmetros de composição corporal analisados,

não foram observadas alterações em resposta à suplementação proposta (Tabela 3). Os resultados encontrados vão na contramão de alguns estudos que reportaram os potenciais terapêuticos dos probióticos em modelar a composição da microbiota intestinal, e em consequência, promover possíveis benefícios no controle do peso e redução da adiposidade abdominal, contribuindo deste modo, para redução do risco cardiometabólico em pessoas com obesidade (BERNINI et al., 2016; GOMES et al, 2017; SZULIŃSKA et al., 2018). E ainda, conforme estes resultados, deve-se considerar que a microbiota intestinal pode sofrer variações de acordo com a ancestralidade geográfica dos indivíduos, influenciando desta forma nos resultados (LAU et al., 2019). Desta forma, um estudo que combinou dieta com suplementação probiótica em mulheres adultas com excesso de peso por 08 semanas, que continha em uma de suas cepas o probiótico *L. lactis*, mostrou redução da adiposidade abdominal, e aumento na atividade das enzimas antioxidantes de maneira mais eficaz no grupo tratamento (dieta normocalórica + suplementação probiótica) quando comparada com uma intervenção dietética isolada (GOMES et al., 2017). Esses achados quando comparados ao nosso estudo, revelam que uso de probióticos quando associados à intervenções dietéticas, podem promover efeitos em relação à redução de gordura corporal, o que não aconteceu em nosso trabalho, em que apenas avaliamos a dieta dos indivíduos, sem promover interferências na alimentação.

Sabe-se que as interações entre a microbiota intestinal e o hospedeiro podem ocorrer em muitos níveis, envolvendo vias de sinalização complexas e uma série de biomoléculas derivadas de micróbios que podem impactar locais distais do intestino, como por exemplo, o LPS gerado pela microbiota (BOHAN et al., 2019). FABERSANI e colaboradores mostraram efeitos da suplementação contendo a cepa *L. lactis* associada a intervenções dietéticas com restrição calórica em modelo animal. O estudo analisou a composição da microbiota intestinal e os parâmetros imunometabólicos e demonstrou que a cepa *L. lactis* possui efeitos potenciais na modulação das alterações imunometabólicas associadas à obesidade (FABERSANI et al., 2019).

Em relação à avaliação das variáveis bioquímicas, não foram encontrados efeitos da suplementação com *L. Lactis*, exceto sobre os níveis de TG, que aumentou significativamente no grupo tratado com *L. Lactis* (Tabela 4). Contudo, não conseguimos avaliar o metagenoma intestinal de nossos voluntários para avaliar possíveis efeitos nos parâmetros moleculares.

Um estudo com animais ligeiramente hipertensos mostrou efeito hipotensor e hipolipemiante pelo uso do *L. lactis* (RODRÍGUEZ-FIGUEROA et al., 2013). E da mesma forma, apesar dos resultados não apresentarem impacto estatístico, BELTRÁN-BARRIENTOS

e colaboradores (2018), identificaram condição similar em relação às alterações de perfil lipídico, utilizando o mesmo suplemento em humanos por oito semanas. Por outro lado, um estudo que combinou as cepas de *L. lactis* e *Bifidobacterium lactis*, mostrou efeitos hipocolesterolêmicos em humanos por oito semanas (NISHIYAMA et al., 2018). E na verdade, nossos resultados contrariam estes achados, visto que os TG aumentaram de forma significativa.

SZULIŃSKA e colaboradores (2018) conduziram um estudo de 12 semanas com mulheres obesas na pós-menopausa utilizando suplemento probiótico multiespécies (contendo nove estirpes), com diferentes dosagens. Os resultados apontaram uma redução significativa nos níveis de glicose, insulina e Homa-IR, melhora no perfil lipídico, circunferência da cintura e gordura visceral, e também na concentração de LPS nos grupos suplementados com dosagens baixa ou alta. Nosso estudo utilizou apenas a cepa *L. lactis* de forma isolada, assim pensamos que a melhora dos parâmetros observados no estudo de SZULIŃSKA possa ser atribuída ao uso de cepas multiespécies.

A literatura tem embasando que há diferenças nas necessidades fisiológicas e nutricionais entre as comunidades bacterianas intestinais, em que certos tipos de dietas podem promover o crescimento de certos membros específicos ou inibir outros (BOHAN et al., 2019).

Ao avaliarmos o consumo alimentar dos voluntários, foi possível identificar oscilações importantes na alimentação que possam ter influenciado o crescimento da bactéria *L. Lactis* no intestino. Ambos os grupos fizeram modificações na alimentação ao longo do tempo. O consumo de carboidratos aumentou significativamente em ambos os grupos. Segundo a IOM, Food and Nutrition Board (2003) a quantidade recomendada de CHOS na dieta deve estar entre 45-65% do total de calorias ingeridas. Encontramos no início da intervenção um consumo de 17,92% de CHOS na dieta do grupo suplementado, seguida de 36,48% no segundo momento, e ao término com 43,58%. Entretanto, apesar do consumo de CHOS ter aumentado ao longo da intervenção, a dieta estava em todos os momentos neste grupo abaixo das recomendações vigentes para CHOS.

Em relação ao consumo de proteínas, foi observado que alimentação dos voluntários estava hiperprotéica no momento inicial, e após, ambos os grupos diminuíram seu consumo ao longo da intervenção. De acordo com as recomendações vigentes, os indivíduos adultos necessitam de uma ingestão de 0,8g de proteína/Kg de peso corporal, sendo que a recomendação total de proteínas deve corresponder de 10-35% das calorias torais da dieta (IOM, 2003). Destacamos que o grupo suplementado teve um consumo de proteico de 44,49% no início, seguido de 24,16%, e ao final 20,28% em relação ao valor calórico da dieta.



Um aumento de gorduras na dieta altera substancialmente a composição da microbiota intestinal. Animais alimentados com uma dieta rica em gordura (40 a 80% da ingestão calórica total) exibem reduções no nível do filo *Bacteroidetes* e aumentos em *Firmicutes* e *Proteobactéria*, o que está relacionado à obesidade (GENTILE; WEIR, 2018). Estudos mostram que a dieta rica em gorduras além de causar alterações graves na microbiota intestinal, promove a abundância de LPS na corrente sanguínea que irão danificar a interface intestinal, e promover uma inflamação crônica de baixo grau no hospedeiro (SZULIŃSKA et al., 2018; BOHAN et al., 2019; SIVAMARUTHI et al., 2019). Portanto, a disbiose entérica induzida por dieta pode ser responsável por obesidade, resistência à insulina, bem como inflamação local e sistêmica (VALLIANOU et al., 2019). O consumo de lipídios dos voluntários foi sugestivamente maior no grupo probiótico, apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa. Conforme a Associação Americana do coração (AHA), as recomendações de lipídeos para um indivíduo saudável devem ser em torno de 30% ou menos do valor energético total (VET) (WAITZBERG, D. L., 2009). Encontramos para o consumo de lipídeos os percentuais de 40,67%, 36,96% e 41,13% do VET da dieta durante os três momentos avaliados respectivamente. Deste modo, supomos que estes percentuais elevados de lipídeos na dieta possam estar relacionados a falta de modificações no peso corporal, percentual de gordura corporal e parâmetros bioquímicos avaliados.

Em relação ao sódio foi mostrado um aumento significativo no consumo do mesmo no grupo probiótico. Sendo a AI (ingestão adequada) de sódio para adultos nesta faixa etária de 1,3-1,5g/dia, para ambos os sexos (IOM, 2004). Este achado sinaliza um possível aumento no consumo de alimentos industrializados (processados e ultraprocessados) pelos voluntários durante o período da pandemia de COVID-19. Desta forma, foi mostrado os efeitos hipertensivos de dietas com alto teor de sal em modelos animais e humanos, que são mediados por níveis reduzidos do filo *Lactobacillus*, e por subsequentes aumentos nas células T auxiliares 17, pró-inflamatórias (GENTILE; WEIR, 2018). Assim, destacamos que o aumento no consumo de sódio na dieta de nossos voluntários possa ter impactado diretamente a microbiota intestinal destes, e influenciado nos efeitos do probiótico na interface intestinal dos mesmos.

A literatura tem demonstrado os efeitos benéficos das fibras solúveis prebióticas, que através da metabolização intestinal, modulam a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios ao hospedeiro, como o aumento na produção de AGCC, dentre eles butirato e propionato (QUIGLEY, 2019). De maneira geral, os prebióticos servem como substratos para a maior parte dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal

(GOMES et al., 2017). Segundo o IOM, 2003 as recomendações para a ingestão de fibras sugerem o total de 38 g/dia para homens e 25g/dia para mulheres. Verificamos que nenhum dos grupos atingiram as necessidades e/ ou quantidades suficientes para fornecer substrato para a microbiota intestinal que é de 24 g/dia (MARUNGRUANG et al., 2018).

Desta forma, as fibras prebióticas são consideradas uma ferramenta nutricional para promover a proliferação bacteriana no intestino delgado, para induzir a modificação da microbiota intestinal e, assim, neutralizar o acúmulo de massa gorda e distúrbios metabólicos relacionados (DURANTI et al., 2017). No entanto, deve ser levado em consideração, que diferentes composições de microbiota intestinal respondem de maneira diversa a diferentes fontes de fibras fermentáveis (WANG et al., 2020).

A literatura tem mostrado que uma dieta rica em gorduras diminui a diversidade de bactérias intestinais, particularmente aquelas envolvidas na produção de AGCCs, enquanto que dietas ricas em fibras têm a capacidade de reverter esse efeito (BOHAN et al., 2019). Um estudo com intervenção de 8 semanas utilizando dieta com fibras alimentares de centeio, cevada, aveia, frutas, legumes e grãos de soja mostrou melhora em uma série de marcadores de risco cardiometabólico em indivíduos com sobrepeso/obesidade (MARUNGRUANG et al., 2018).

Acreditamos que a baixa ingestão de fibras associada ao alto consumo de gorduras observada em nosso estudo, possa ter influenciado negativamente nos efeitos da cepa *L. Lactis* sobre as variáveis avaliadas. Entretanto, é importante salientar que a avaliação da ingestão de fibras solúveis foi um fator limitante em nosso estudo, devido ao fato de que não obtivemos informações sobre os tipos de fibras consumidas (fermentáveis e não fermentáveis). Analisar o consumo de fibra solúvel seria de grande relevância para nossos resultados, pois a ausência das fibras fermentáveis na dieta pode ter influenciado nos mecanismos de ação do probiótico dificultado seus efeitos.

Dentre as limitações deste estudo destacamos que (i) não foi avaliada a composição da microbiota intestinal por meio de sequenciamento genético, (ii) não foi analisada a função imunológica, por meio de dosagens de citocinas séricas e/ou células T efetoras x reguladoras, (iii) não houve controle dietético no consumo dos tipos de fibras exigidos para o crescimento bacteriano, e (iv) o baixo tamanho amostral possa ter influenciado na falta de resultados estaticamente significativos.

## 6 CONCLUSÃO

Podemos inferir que a suplementação com *L. lactis* utilizada no presente estudo não teve efeito modulador sobre os parâmetros de risco cardiometabólicos, antropométricos e de composição corporal em indivíduos com obesidade. Entretanto, é possível que tais resultados poderiam ser promissores usando uma dosagem maior de probióticos, associação de *L. lactis* a outras cepas bacterianas, maior número amostral e tempo de suplementação, fazendo intervenções dietéticas, ou ainda, todos estes fatores de forma conjunta. Em adição do exposto, deve ser levado em conta a complexibilidade da microbiota intestinal, e os vários fatores interferentes na mesma, como a dieta, estilo de vida, e as particularidades de cada indivíduo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENAVOLI, L. et al. Gut microbiota and obesity: a role for probiotics. **Nutrients**, v. 11, p.2690, 2019.
- AGUIAR, S. L. F. et al. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-12, 2018.
- ANDRADE, V. L. A. et al. Obesity and intestinal microbiota. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 4, p. 583-589, 2015.
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 15718-15723, 2004.
- BELTRÁN-BARRIENTOS, L. M. et al. Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure-lowering effect of fermented milk with lactococcus lactis: A pilot study2. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2819-2825, 2018.
- BERNINI, L. 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, 2016.
- BEZERRA, A. N. et al. Efeito da suplementação de probióticos no diabetes mellitus: uma revisão sistemática. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 15, n. 2, p. 129-139, 2016.
- BOHAN, R. et al. Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2019.
- BRAHE, L.K.; ASTRUP, A.; LARSEN, L.H. Can we prevent obesity-related metabolic diseases by dietary modulation of the gut microbiota? **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 90-101, 2016.
- BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. H. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 715–723, 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN**, p. 76, Brasília, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Nacional de Saúde 2020-2023**. Bvsm, p. 1–159, 2020.

BRUSAFERRO, A. et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity? **Nutrients**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2018.

CASTRO, M. A. DE. **Manual de críticas de inquéritos alimentares**. 2013.

CERDÓ, T. et al. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. **Nutrients**, v. 11 (3), n. 635, 2019.

DAO, M. C.; CLÉMENT, K. Gut microbiota and obesity: concepts relevant to clinical care. **European Journal of Internal Medicine**, v. 48, n. 1 fev. p. 18-24, 2018.

DE LEBLANC, A. M. DE; LEBLANC, J. G. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 44, p. 16518-16528, 2014.

DE MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: Mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 4, p. 317-327, 2014.

DING, R. XUE et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 3, p. 623-631, 2019.

Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 10 setembro de 2021.

DURANTI, S. et al. Obesity and microbiota: An example of an intricate relationship. **Genes and Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2017.

FABERSANI, E. et al. Modulation of intestinal microbiota and immunometabolic parameters by caloric restriction and lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 124, n. June 2018, p. 188-199, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Probiotics in Food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**, FAO, Rome, Italy, 2006.

GENTILE, C. L.; WEIR, T. L. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. **Science**, v. 362, n. 6416, p. 776-780, 2018.

GOMES, A. C. et al. The additional effects of a probiotic mix on abdominal adiposity and antioxidant Status: A double-blind, randomized trial. **Obesity**, v. 25, n. 1, p. 30-38, 2017.

GOMES, A. C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J. F. Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific genera. **European Journal of Nutrition**, 2020.

GOMES-SANTOS, A. C. et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 560817, 2012.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 2, p. 433–438, 2004.

HARO, C. et al. Consumption of two healthy dietary patterns restored microbiota dysbiosis in obese patients with metabolic dysfunction. **Molecular Nutrition @Food Research**, v. 61, n. 12, 2017.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. **New England Journal of medicine**, v. 376, n. 3, p. 254–266, 2017.

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

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes: Guiding Principles for Nutrition Labeling and Fortification**. Washington, DC: National Academies Press, 2003. Disponível em: [https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic\\_uploads//guiding\\_principles\\_labeling\\_full\\_report.pdf](https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads//guiding_principles_labeling_full_report.pdf). Acesso em 26 jul. 2021.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and sulfate**. Washington, DC: National Academies Press, 2004. Disponível: <https://www.nap.edu/catalog/10925/dietary-reference-intakes-for-water-potassium-sodium-chloride-and-sulfate>. Acesso: 28 jul. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50002.pdf>. Acesso em: 20 março. 2021.

KOBYLIAK, N. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, n. 14, 2016.

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

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality, **International Dairy Journal**, 2006.

LAU, E. et al. Probiotic Ingestion, Obesity, and Metabolic-Related Disorders: Results from NHANES, 1999-2014. **Nutrients**, n.11, v. 7, p. 1482, 2019.

LEE, H. Y. et al. Human originated bacteria, lactobacillus rhamnosus PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 736-744, 2006.

MARUNGRUANG, N. et al. Improvement in cardiometabolic risk markers following a multifunctional diet is associated with gut microbial taxa in healthy overweight and obese subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 2927–2936, 2018.

MATHEWS 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, p. 412-419, 1985.

MAZLOOM, K.; SIDDIQI, I.; COVASA, M. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity? **Nutrients**, v. 11, n. 2, 1 fev, 2019.

NEVES, A. L. et al. The microbiome and its pharmacological targets: Therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 25, p. 36–44, 2015.

NISHIYAMA, K. et al. A double-blind controlled study to evaluate the effects of yogurt enriched with lactococcus lactis 11/19-b1 and bifidobacterium lactis on serum low-density lipoprotein level and antigen-specific interferon- $\gamma$  releasing ability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1-8, 2018.

NOBS, S. P.; ZMORA, N.; ELINAV, E. Nutrition regulates innate immunity in health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 40, p. 189-219, 2020.

NOCE, A. et al. Impact of gut microbiota composition on onset and progression of chronic non-communicable diseases. **Nutrients**, v. 11 (5) n. 1073, 2019.

OTT, B. et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

PARKER, E. A. et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125- 134.e11, 1 jan. 2018.

PEDROGO, D. A. M. et al. Gut microbial carbohydrate metabolism hinders weight loss in overweight adults undergoing lifestyle intervention with a volumetric diet. **Mayo Clinical Proceedings**, v. 93, n. 8, p. 1104-1110, 2018.

PINHEIRO, A.B.V. et al. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 5ªed. São Paulo: Atheneu, 2008.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics in digestive health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 333-344, 2019.

REIMER, R. A. et al. Inulin-type fructans and whey protein both modulate appetite but only fructans alter gut microbiota in adults with overweight/obesity: a randomized controlled trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol. 61, n. 11, 2017.

REZENDE, R. M. et al. AMC. HSP65-producing lactococcus lactis prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory Tcells. **Journal, Autoimmun**, v. 40, p. 45-57, 2013.

RODRÍGUEZ, J. M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, 2015.

RODRÍGUEZ-FIGUEROA, J. C. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. **Journal of Dairy Science**, 2010.

RODRÍGUEZ-FIGUEROA, J. C. et al. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4094-4099, 2013.

RODRÍGUEZ-FIGUEROA, J. C. et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. **Journal of Dairy Science**, 2012.

RUAN, Y. et al. Effect of probiotics on glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.

SCHELE, E. et al. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. **Endocrinology**, v. 154, p. 3643–3651, 2013.

SIVAMARUTHI, B. S. et al. A Review on Role of Microbiome in Obesity and Antiobesity Properties of Probiotic Supplements. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

SZULIŃSKA, M. et al. Dose-dependent effects of multispecies probiotic supplementation on the lipopolysaccharide (LPS) level and cardiometabolic profile in obese postmenopausal women: A 12-week randomized clinical trial. **Nutrients**, v. 10, n. 6, 2018.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031, 2006.

VALLIANOU, N. et al. Understanding the Role of The Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and perspectives. **Current Obesity Reports**, v. 8, n. 3, p. 317-332, 2019.

WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009.

WANG, Y. et al. Associations of sodium and potassium consumption with the gut microbiota and host metabolites in a population-based study in Chinese adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 112, n. 6, p. 1599–1612, 2020.

WANG, Y. et al. Circulating short-chain fatty acids are positively associated with adiposity measures in chinese adults. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1-15, 2020.

WHITE, N. D. Gut Microbiota and Obesity: Potential Therapeutic Targets and Probiotic Treatment. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 10, n. 2, p. 104–106, 1 mar. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Consultation on Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. World Health Organization, Geneva, 1998. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>. Acesso em: 18 junho. 2021.



WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Physical Status. The use of and interpretation of Anthropometry.** World Health Organization technical report series, 1995. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37003>. Acesso: 15 julho. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Preventing and Managing the Global Epidemic;** World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2000. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>. Acesso em: 22 julho. 2021.

YOO, J. Y.; KIM, S. S. Probiotics and prebiotics: Present status and future perspectives on metabolic disorders. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1–20, 2016.

ZHANG, N.; JU, Z.; ZUO, T. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. **Nutrition**, v. 51-52, p. 80-85, 1 jul. 2018.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

Versão preliminar de artigo elaborado conforme as normas para submissão no periódico científico “ARCHIVES OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM”, estrato B1 na avaliação de periódicos Qualis CAPES na área de Nutrição.

**EFFECTS OF LACTOCOCCUS LACTIS (LMG 27352) SUPPLEMENTATION ON  
OBESITY-ASSOCIATED CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS: A  
RANDOMIZED CLINICAL TRIAL**

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Changes in the intestinal microbiota (IM) play a prominent role in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases, however, the mechanisms involved are still not fully described. Due to the increasing prevalence of obesity and its implications for IM, this study aimed to evaluate the effects of administering *Lactococcus Lactis* (LMG 27352) probiotic on cardiometabolic risk variables in overweight/obese individuals. **Methods:** 52 adults who met the inclusion criteria for high waist circumference and at least one cardiometabolic risk factor associated with obesity, namely: blood pressure, triglycerides, blood glucose above their respective references; HDL-c below its reference or under drug treatment. This is a randomized, prospective, triple-blind, placebo-controlled 90-day clinical trial with a REBEC registry (Rbr-9qxx9j). Volunteers were divided into two groups: placebo (PLA) or probiotic (PRO) (n=26 each) and evaluated through anthropometry, body composition, food consumption, and laboratory analysis. **Results:** We found a significant change on triglycerides levels in the PRO group (135.4mg/dL vs. 164.1mg/dL) (P=0.010). No significant effects were found on the other variables. Regarding food consumption, there was a significant increase in carbohydrate intake in both groups and sodium in the PRO group. **Conclusion:** Supplementation of *Lactococcus lactis* (LMG 27352) without dietary control had no effects on laboratory, anthropometric and body composition parameters used in this study, in the evaluated sample.

**Keywords:** Obesity. Cardiometabolic Risk Factors. Lactic acid bacteria. *Lactococcus lactis*.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como o acúmulo anormal de gordura que pode ser prejudicial à saúde (1). Caracterizada pela elevação do risco ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica e certos tipos de câncer (2,3). Sua prevalência tem aumentado continuamente, já sendo considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (4).

A microbiota intestinal (MI) é definida como um órgão totalmente integrado ao hospedeiro, que desempenha papel importante em seu metabolismo, fisiologia, nutrição e funções imunológicas (5). Estudos mostram que alterações na composição e/ou estrutura da MI podem ter importantes repercussões na saúde ou doença, e que a disbiose da MI tem sido associada à obesidade e disfunções metabólicas relacionadas (6, 7, 8, 9).

Tem sido demonstrado que indivíduos obesos têm uma redução na diversidade e riqueza da microbiota intestinal, com redução do filo Bacteroidetes e níveis mais altos de Firmicutes, porém, há muito a se debater sobre a MI de indivíduos saudáveis ou com obesidade (9,10,11). Atualmente tem aumentado o interesse em pesquisas que investiguem o papel da MI como fator intermediário entre componentes ambientais e comportamentais, e a ocorrência da obesidade e dos distúrbios metabólicos entre os indivíduos, além do uso de probióticos na sua modulação (1,12, 13).

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde dos indivíduos quando administrados em doses suficientes. (14) Entre seus benefícios estão: modificações da composição da MI, fortalecimento da barreira intestinal, adesão competitiva à mucosa, produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (10,15, 16).

Diante da necessidade de promover o equilíbrio da MI de indivíduos com obesidade, este estudo teve por objetivo investigar os efeitos da administração da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* (LMG 27352) nas variáveis de risco cardiometabólico associadas à obesidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Protocolo de estudo

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, prospectivo, triplo cego e controlado por placebo. O protocolo foi desenvolvido no Centro de Especialidades Médicas (CEM), em Três Corações-MG- Brasil. O recrutamento foi entre novembro e dezembro de 2019, e as visitas clínicas de janeiro a maio de 2020. A divulgação do estudo foi feita por meio de cartazes e abordagem dos pacientes do CEM.

Os voluntários foram pareados por sexo e IMC e randomizados usando um gerador de números aleatórios computadorizado, e alocados em dois grupos: i) placebo ou ii) tratamento. Um pesquisador independente alocou os números de randomização, e forneceu a lista aos responsáveis pela manipulação das cápsulas. Estavam cegos os participantes, pesquisador e responsável pelas análises, sendo o código de cegamento fornecido após a conclusão das análises.

Os indivíduos foram avaliados no início (t0), em que foram coletados os dados antropométricos, as amostras bioquímicas, feita a avaliação da composição corporal (Bioimpedância elétrica), e aplicado o recordatório alimentar de 24 h.

A adesão ao tratamento foi avaliada pela contagem de cápsulas devolvidas nos frascos durante as visitas a cada 15 dias ao CEM. O pesquisador também manteve contato com os voluntários por meio do aplicativo WhatsApp, sendo criado um grupo para facilitar a comunicação entre os mesmos. Uma palestra foi realizada no t0 da intervenção, que abordou temas relacionados as funções da microbiota intestinal e sua relação com a saúde/ ou doença, e os benefícios de um modo geral do uso dos probióticos.

### Assuntos

Os que concordaram em participar do estudo e se enquadraram nos critérios de inclusão, deram seu consentimento por escrito. Este estudo foi submetido ao Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos – REBEC (Rbr-9qxx9j).

Para a seleção dos voluntários foram adotados os seguintes critérios:

(i) inclusão: ter idade  $\geq 20$  e  $\leq 60$  anos, Índice de Massa Corporal (IMC) de 30,0 a 39,9 Kg/m<sup>2</sup> (17), e apresentar circunferência da cintura elevada sendo: > 102 cm para homens e >

88 cm para mulheres (18), e ainda, apresentar algum tipo de alteração metabólica associada à obesidade como: pressão arterial > 130 mmHg (sistólica) ou > 85 mmHg (diastólica), ou em tratamento com droga anti-hipertensiva; triglicerídeos > 150 mg/dL, ou já em tratamento medicamentoso; HDL-c < 40 mg / dL para homens, e < 50 mg / dL para mulheres, ou em uso de medicamento para níveis baixos de HDL-c; Glicemia > 100 mg/dL, ou em uso com fármacos para hiperglicemia, e ser capaz de seguir o protocolo de estudo.

(ii) Critérios de não inclusão: IMC  $\geq$  40,0 kg/m<sup>2</sup>, e uso de grandes doses de probióticos nos últimos 06 meses ( $\geq$  a 10<sup>8</sup> UFC- unidades formadoras de colônia/ dia), incluídos: comprimidos, cápsulas, pastilhas, gomas de mascar ou pó nos quais o probiótico é o componente primário, seu uso deveria ser descontinuado e evitado por um mês antes do início do estudo. O consumo dietético de alimentos fermentados como leites, bebidas ou iogurtes não se aplicaram.

### **Suplementação probiótica**

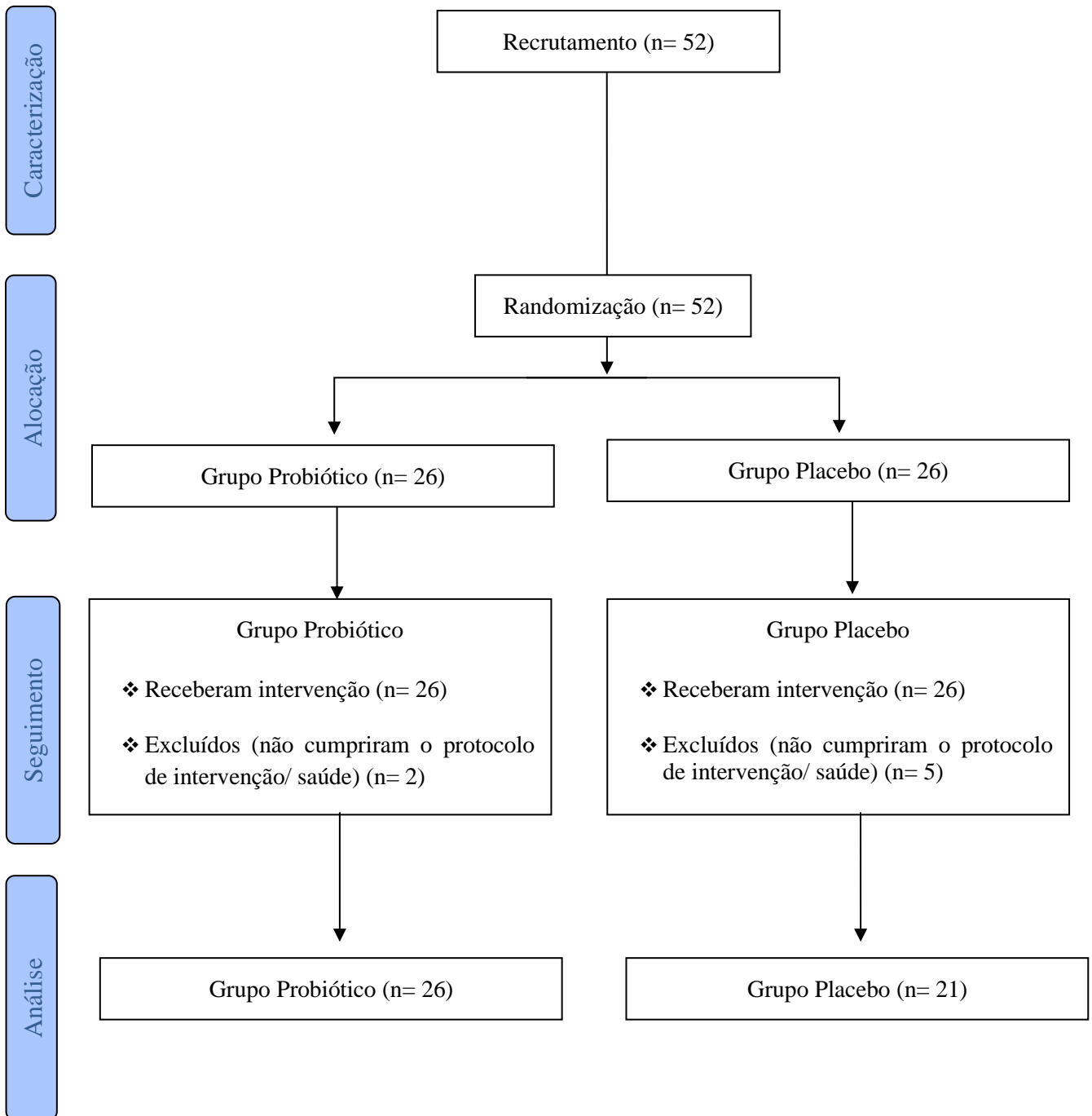
Um total de 52 indivíduos foram eleitos, e após a randomização receberam: (i) placebo - 20mg de celulose (n = 26) e (ii) probiótico - 20 mg de *L. lactis* (LMG 27352), com tensão 2x10<sup>9</sup> UFC/dia (n = 26).

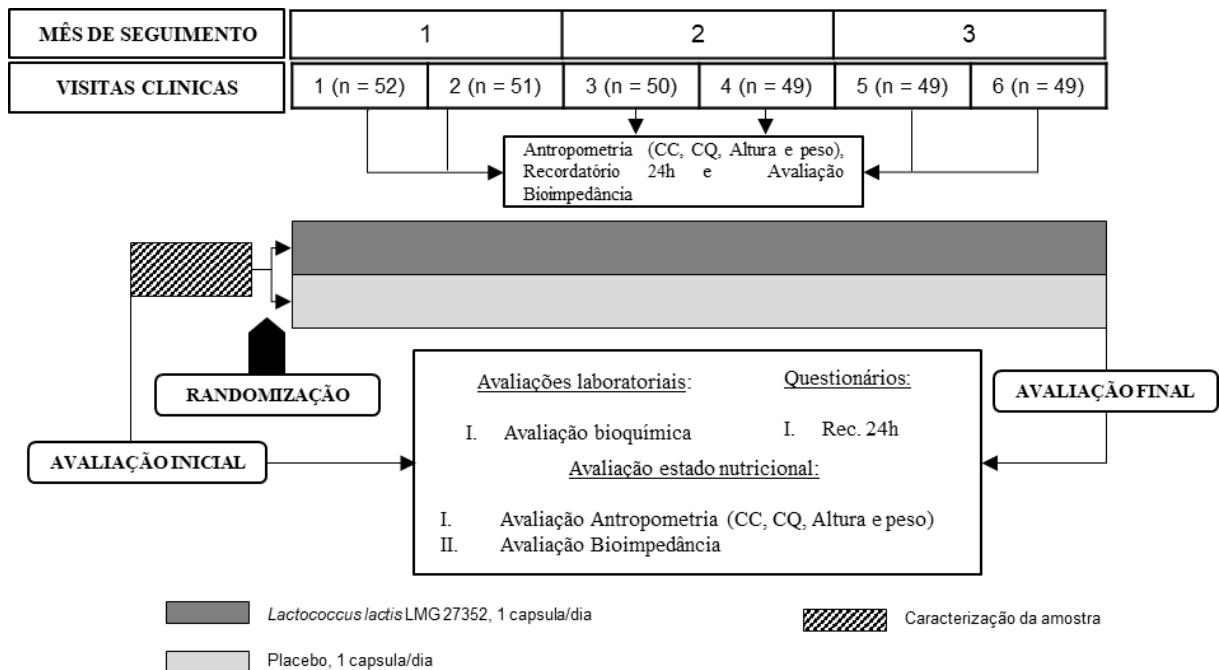
A cepa probiótica foi cedida pela Coana Importação e Exportação Ltda - Florianópolis-SC, e a manipulação das cápsulas realizada pela farmácia Néctar-Três Corações-MG. Os microrganismos estavam na forma liofilizada, e juntamente com o placebo foram encapsulados na forma vegetal, ambas as cápsulas se apresentaram idênticas.

Os participantes foram instruídos a ingerir uma cápsula do probiótico ou placebo diariamente pela manhã, e a manter suas dietas usuais, nível de atividade física ou outros fatores de estilo de vida habitual ao longo da intervenção. Foram orientados a não acondicionar o probiótico em geladeira, porém, deveriam evitar locais fechados ou sob calor intenso.

Os voluntários receberam tratamento por 90 dias, e deveriam retornar quinzenalmente para receber as cápsulas e devolver os frascos já consumidos. Nas visitas a antropometria foi reavaliada, conforme mostrado (Figura 1).

**Figura 1.** Fluxograma das avaliações.





### Antropometria, composição corporal e consumo alimentar

A avaliação antropométrica foi realizada no t0 e durante todas as visitas. Foram coletados o peso corporal (Kg), estatura (cm), circunferência da cintura (CQ) e circunferência de quadril (CQ), ambas em centímetros, e feito cálculo do IMC (Kg/m<sup>2</sup>). Foi utilizada a balança digital (New Balmak) com estadiômetro acoplado para as avaliações de peso e estatura e fita inelástica para a circunferência de cintura e quadril. O peso foi aferido com a aproximação de 0,1 kg e com uso de roupas leves, e altura foi medida sem sapatos com aproximação de 0,1 cm, a CC foi medida com aproximação de 0,1 cm na linha natural da cintura, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, e a CQ medida pelo maior perímetro entre a cintura e a coxa (19).

A composição corporal foi analisada por bioimpedância elétrica (BIA), modelo BIODYNAMICS 310, que mensurou a massa magra (Kg) e a massa gorda em Kg e percentual, e o volume de água corporal total no t0 e final da intervenção.

Conforme as orientações do fabricante, os participantes seguiram um protocolo no dia anterior ao exame de BIA, devendo:

- Ingerir de 1,5-2 litros de água no dia anterior;
- Não realizar exercícios físicos nas 24h antecedentes;
- Não ingerir álcool e alimentos cafeinados (café, chá, chocolate) 24h antes;



- Fazer refeição leve antes do jejum de 4h.

O consumo alimentar foi avaliado por recordatório alimentar de 24h que foram aplicados no t0 (i), com 45 dias (ii) e final do protocolo (iii).

Foram registrados nos recordatórios todos os alimentos com suas respectivas quantidades consumidas na véspera da avaliação. O consumo foi registrado em medidas caseiras, e ao final das avaliações, todas as informações foram conferidas. Para realizar as análises dos recordatórios, estes foram padronizados e os alimentos convertidos em gramas e mililitros. Foram utilizadas a Tabela de Avaliação do Consumo em Medidas Caseiras (20), e a Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil (21), e o Manual de Críticas de Inquéritos Alimentares (22) para as padronizações, e que foram adotados:

- Adicionar a todos os recordatórios uma colher sopa (8grs.) de óleo de soja, para cada refeição (almoço e jantar);
- Adicionar um fio de azeite de oliva (0,5 mL), e uma pitada de sal (0,35 grs.), em saladas quando não especificado;
- Para os legumes quando não informado a forma de preparo, foi considerado como cozido.

O *Software* Dietpro clínico foi utilizado para avaliar a composição nutricional da dieta, que quantificou o consumo energético, dos macronutrientes e de fibras.

### **Medições bioquímicas**

Os indivíduos foram submetidos a análises laboratoriais no t0, e após 90 dias de tratamento. As amostras de sangue foram coletadas pela manhã, após jejum noturno de 12 horas, e as análises foram realizadas no laboratório municipal (público), ou em rede particular quando optado pelo participante, que financiou seus custos.

Foram avaliadas as análises bioquímicas: hemograma completo, glicose, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL-c), triacilgliceróis (TGs), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), hemoglobina glicada, insulina e realizado cálculo do Homa-IR (Equação 1) (23).

$$\text{Homa-IR} = \text{Glicose jejum (mmol/L)} \times \text{Insulina jejum (uU/mL)} \div 22,5 \quad (1)$$

## **Cálculo amostral e estatística**

Foi adotado nível de significância de 5%, poder estatístico de 0,8 e tamanho do efeito mediano de 0,4 (24), sendo necessário uma amostra total de 52 indivíduos que foram divididos em dois grupos: controle (n= 26) ou tratamento (n= 26).

Foi testada a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas em logaritmo (Log10) para as análises.

Para comparar as diferenças entre os grupos na linha de base foi utilizado o teste T de Student para amostras independentes, e o teste Anova para medidas repetidas por GLM foi usado para identificar os efeitos da intervenção. Os dados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (DP).

O *software* SPSS (versão 20.0) foi utilizado para as análises, e foi adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes estatísticos.

## RESULTADOS

### Caracterização da amostra

Foram incluídos 52 participantes, sendo 11 homens (21,2%) e 41 mulheres (78,8 %), após randomização dos grupos 26 receberam tratamento com *L. lactis* e 26 o placebo. Cinco indivíduos desistiram devido as restrições impostas pela pandemia de COVID 19.

A Tabela 1 mostra as características dos participantes no momento inicial do estudo (t0). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a idade, e características antropométricas como o peso corporal, IMC e circunferências de cintura e quadril.

**Tabela 1.** Características iniciais dos grupos tratado e controle.

Variável	Todos	Grupo: Tratado (média ± DP)	Grupo: Controle (média ± DP)	p
Idade	45,4±8,2	44,6±8,8	46,1±7,6	0,513
Peso (Kg)	90,2±12,4	89,4±12,4	91,1±12,6	0,611
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	34,2±2,7	34,2±2,8	34,1±2,7	0,942
CC (cm)	107,5±9,0	106,5±9,7	108,6±8,3	0,391
CQ (cm)	116,4±7,7	117,3±9,05	115,6±6,2	0,426

Valores apresentados em média ± DP: IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CQ= circunferência do quadril.

*Teste T de Student* para amostras independentes.

\*(p<0,05).

### Variáveis antropométricas

A Tabela 2 apresenta o efeito da intervenção sobre as variáveis antropométricas estudadas.

Foi observado um efeito significativo (p<0,05), para a variável circunferência de cintura ao longo do tempo, ou seja, sem efeitos da intervenção, que é somente a interação entre Tempo x Grupos (T x G). Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para as demais variáveis analisadas.

**Tabela 2.** Variáveis antropométricas dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado		Grupo: Controle		Tempo	p	
	Inicial	Final	Inicial	Final		Grupo	T x G
Peso (kg)	89,4±12,4	89,6±11,8	91,1±12,6	85,2±12,3	0,333	0,735	0,132
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	34,2±2,8	34,3±2,7	34,1±2,7	33,8±2,7	0,407	0,688	0,132
CC (cm)	106,5±9,7	105,9±8,6	108,6±8,3	106,9±6,8	0,025*	0,452	0,480
CQ (cm)	117,3±9,0	117,6±8,3	115,6±6,2	114,5±7,3	0,395	0,262	0,175

Valores apresentados em média ± DP: IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CQ= circunferência do quadril. Anova para medidas repetidas, GLM.

T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

### Composição corporal

A avaliação da composição corporal foi realizada por bioimpedância elétrica (BIA), que foram obtidas as medidas de massa magra (Kg), massa gorda (kg e %) e volume de água corporal total.

Foi observado um efeito do tempo sobre as variáveis de MM (kg) e água na massa magra (AMM). Para as demais variáveis não foram encontrados resultados estatisticamente significativos da intervenção (Tabela 3).

**Tabela 3.** Composição corporal dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo Tratado		Grupo Controle		Tempo	p	
	Inicial	Final	Inicial	Final		Grupo	T x G
Bioresistência	483,1 ±62,2	485,9 ±106,6	474,4 ±64,9	489,4 ±71,5	0,775	0,716	0,363
Reatância	59,3 ±6,9	58,6 ±7,4	57,7 ±8,7	58,4 ±9,2	0,331	0,283	0,366
MM (kg)	55,9 ±9,8	55,0 ±8,3	57,4± 10,1	57,0 ±10,6	0,031*	0,519	0,539
MG (Kg)	33,4 ±6,5	34,0 ±6,3	33,6 ±5,4	33,1 ±5,5	0,863	0,903	0,122
MG (%)	37,46 ±5,19	38,25 ±4,91	37,10 ±4,61	36,97 ±5,39	0,340	0,581	0,088
ACT (L)	40,60 ±8,15	39,69 ±6,50	41,98 ±8,71	41,78 ±9,06	0,116	0,448	0,443
AMM	72,00 ±2,60	71,83 ±2,42	72,00 ±2,60	72,53 ±2,76	0,000*	0,338	0,334

Valores apresentados em média ± DP: MM= Massa Magra, MG= Massa Gorda;  
 ACT= Água Corporal Total; AMM= Água na Massa Magra.  
 Anova para medidas repetidas, GLM.  
 T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

### Parâmetros bioquímicos

Os resultados encontrados das análises bioquímicas estão descritos na Tabela 4. Foi observado um efeito aleatório, nas variáveis de perfil lipídico (CT, VLDL-c) e para a variável hemodinâmica RDW, apenas em função do tempo, ou seja, sem relação com a intervenção proposta.

A análise também demonstrou um efeito do grupo (independente do tempo) sobre as variáveis glicose, hemoglobina glicada (HbA1c), e Homa-IR, todos maiores no grupo tratamento em relação ao placebo nos dois momentos. Foi observado o mesmo efeito na variável Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO), sendo maior no grupo tratamento em ambos os momentos.

A única variável em que foram observados efeitos estatisticamente significativos da intervenção (interação tempo vs grupo), foi para Triacilgliceróis plasmáticos (TG). O teste de

post-hoc demonstrou que houve um aumento dos TG no grupo tratado com o probiótico (Tabela 4).

**Tabela 4.** Variáveis bioquímicas dos grupos tratado e controle antes e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado		Grupo: Controle		Tempo	p	
	Inicial	Final	Inicial	Final		Grupo	T x G
Glicose	116,9±69,8	111,6±36,9	92,1±14,8	96,3±19,9	0,468	0,060	0,593
HbA1c	6,3±1,9	6,22±1,4	5,65±0,5	5,5±0,5	0,465	0,058	0,665
Insulina	12,5±7,9	11,9±5,9	11,1±6,3	9,7±6,0	0,649	0,211	0,252
Homa-IR	3,5±2,6	3,25±1,8	2,5±1,5	2,3±1,4	0,893	0,048*	0,411
CT	194,3±52,6	205,1±44,2	188,9±29,4	195,7±34,4	0,046*	0,767	0,324
TG	135,4±104,5	164,1±83,9	138,7±69,5	127,5±83,8	0,449	0,189	<b>0,010*</b>
LDL-c	111,9±39,4	120,4±34,0	106,1±29,0	107,2±31,9	0,149	0,364	0,122
HDL-c	57,3±10,9	54,0±10,2	57,1±14,7	59,1±16,0	0,570	0,413	0,145
VLDL-c	24,2±12,6	30,7±15,0	25,8±11,4	29,3±12,7	0,000*	0,827	0,129
HM	4,6±0,4	4,8±0,61	4,8±0,6	27,8±62,6	0,065	0,064	0,069
HB	13,0±1,3	13,4±1,6	13,2±1,5	13,3±1,8	0,076	0,859	0,061
HT	39,0±5,9	41,1±4,5	40,5±3,9	40,7±5,0	0,152	0,558	0,110
VCM	87,1±4,8	86,2±5,6	84,1±8,1	83,4±8,8	0,075	0,124	0,977
HCM	28,3±2,1	28,1±2,0	27,3±2,9	27,3±3,3	0,294	0,224	0,778
CHCM	32,5±1,3	32,6±0,8	32,6±1,5	32,6±1,1	0,604	0,896	0,749
RDW	13,0±1,0	13,6±1,3	14,0±0,02	11,8±5,3	0,000*	0,085	0,084
Leucócitos	6218,5± 1568,3	6785,8± 1754,5	6438,5± 1396,6	6510,8± 1700,5	0,073	0,927	0,196
Plaquetas	255384,6 ±69131,2	266153,8 ±78090,5	246576,9 ±64573,8	245800,0 ±69382,4	0,434	0,439	0,378
TGO	24,9±10,5	22,8±7,2	19,3±5,5	19,7±6,9	0,590	0,012*	0,343
TGP	22,5±11,8	21,7±11,1	18,9±8,6	17,5±6,6	0,261	0,140	0,707
GGT	33,7±28,1	30,8±12,3	31,3±12,6	31,5±15,7	0,989	0,930	0,870

Valores apresentados em média ± DP: CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; CT = colesterol total; GGT= gama glutamil transferase; HbA1c= hemoglobina glicada; HDL-c= colesterol de lipoproteína de alta densidade; HB= hemoglobina; HCM= hemoglobina corpuscular média; HM= hemácias; HT= hematócrito; LDL-c = colesterol de lipoproteína de baixa densidade; RDW= amplitude de distribuição dos eritrócitos; TG = triglicerídeos, TGO= Transaminase Hepática Oxalacética; TGP= alanina aminotransferase; VCM= valor corpuscular médio; VLDL-c= lipoproteína de muita baixa densidade.

Anova para medidas repetidas, GLM. T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).

## **Consumo alimentar**

O consumo alimentar foi acompanhado durante o estudo com o objetivo de avaliar uma possível interferência da alimentação nos resultados. A análise foi feita por meio da aplicação do recordatório alimentar de 24h que foi realizado no início (i), com 45 dias (ii) e ao final do protocolo(iii).

O valor calórico consumido pelos grupos foi semelhante durante todo o período de estudo. Em relação à ingestão dos macronutrientes, foi observado um aumento no consumo de carboidratos (CHOS) ao longo da intervenção, em ambos os grupos (Tabela 5).

Também observamos nos resultados que a dieta dos voluntários estava hiperprotéica no início do estudo. As análises demonstraram que ocorreu uma redução no consumo de proteínas entre os grupos ao longo do tempo da suplementação.

Em relação a ingestão de gorduras, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados.

Já o eletrólito sódio (Na), apresentou resultado estatisticamente significativo, os resultados mostraram um aumento no consumo do mesmo no grupo suplementado e redução ao final no grupo placebo.

Abordando a quantidade de fibras consumidas pelos grupos, os resultados não se mostraram significativos, porém, estavam abaixo das necessidades diárias em ambos os grupos, conforme demonstrado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Consumo alimentar dos grupos tratado e controle antes, durante e após intervenção.

Variável	Grupo: Tratado			Grupo: Controle			Tempo	p	
	Início	Meio	Final	Início	Meio	Final		Grupo	T x G
Kcal	1488,4 ±577,6	1555,9 ±709,8	1517,1 ±454,6	1528,8 ±620,2	1488,8 ±433,1	1297,1 ±489,9	0,276	0,464	0,164
PTN (g)	165,5 ±81,0	94,0 ±63,3	76,9 ±41,6	152,2 ±84,3	115,6 ±54,6	68,7 ±41,5	0,000*	0,423	0,844
CHO (g)	66,7 ±44,6	141,9 ±94,7	165,3 ±80,9	88,3 ±56,8	116,1 ±75,3	142,4 ±75,1	0,000*	0,709	<b>0,048</b> *
LP (g)	67,2 ±30,1	63,9 ±28,0	69,3 ±35,7	61,7 ±24,6	61,7 ±24,0	51,2 ±21,5	0,420	0,066	0,229
Na (mg)	1485,7 ±830,9	1509,1± 1026,1	2095,6± 1454,2	1621,7 ±867,8	1672,9 ±821,8	1359,3 ±834,4	0,710	0,296	<b>0,011</b> *
Fibras (g)	11,8 ±5,9	17,0 ±10,6	16,0 ±7,5	13,3 ±8,4	15,5 ±6,6	13,2 ±8,73	0,134	0,695	0,111

Valores apresentados em média ± DP: Kcal= quilocalorias; PTN= proteína, CHO= carboidratos; LP= Lipídios; Na= sódio. Anova para medidas repetidas, GLM.

T x G (interação tempo x grupo) \*(p<0,05).



## DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo estudar os possíveis efeitos da administração da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* (LMG 27352) sobre parâmetros de risco cardiometabólicos associados à obesidade. A hipótese partiu de estudos em modelos animais que mostraram efeitos antiinflamatórios pelo uso de *L. lactis* (24, 25). Esta cepa já foi utilizada em alguns trabalhos, em modelos animais e humanos, na forma isolada ou combinada a outras cepas e por tempos diferentes de intervenção (26,27,28).

Destacamos ser este estudo o primeiro a utilizar a cepa *L. lactis* na dosagem de  $2 \times 10^9$  UFC/dia, na forma isolada em humanos. Foram avaliadas as variáveis antropométricas, de composição corporal, e também os parâmetros bioquímicos relacionados ao risco cardiovascular em indivíduos obesos. A legislação brasileira recomenda que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/dia do produto pronto para consumo (29). Desta forma, a suplementação na dosagem de  $2 \times 10^9$  UFC/dia, atendeu as recomendações da quantidade mínima sugerida para obtenção dos benefícios com probióticos. Foi optado por não utilizar dosagens maiores para evitar o comprometimento da tolerância intestinal dos voluntários. Ainda, priorizamos por desenvolver nosso estudo por 12 semanas e que, comparado a outros que fizeram em menor tempo, como garantia de que a suplementação por um tempo maior promoveria resultados positivos (30,31, 32).

Sabe-se que a MI produz moléculas ativas de sinalização que interagem com o metabolismo do hospedeiro (33). Sugere-se um dos mecanismos envolvidos através da fermentação das fibras pela microbiota e consequente produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que interagem com os receptores acoplados à proteína G, e afetam a sensibilidade à insulina em adipócitos e órgãos periféricos, regulando assim o metabolismo energético (2). Portanto, tem sido relatado que uma possível melhora na composição corporal devido à administração de probióticos, pode ocorrer em consequência da supressão do fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF) no intestino, que modula a produção de AGCCs, regulando assim o metabolismo energético do hospedeiro (34).

Nossos resultados mostraram que a suplementação com *L. lactis* não teve efeito sobre as variáveis antropométricas e sobre os parâmetros de composição corporal (Tabela 3). Estes resultados vão na contramão de alguns estudos que reportaram os potenciais terapêuticos dos probióticos em modelar a composição da MI, e em consequência, promover possíveis benefícios no controle do peso e redução da adiposidade abdominal (2,24,30). Desta forma,

devemos considerar que a microbiota intestinal pode sofrer variações de acordo com a ancestralidade geográfica dos indivíduos, influenciando os resultados (6). Entretanto, um estudo com mulheres adultas com excesso de peso/obesidade, que receberam uma suplementação probiótica combinada por 08 semanas, contendo em uma de suas cepas o probiótico *L. lactis*, mostrou redução da adiposidade abdominal, e aumento na atividade das enzimas antioxidantes de maneira mais eficaz no grupo tratamento (dieta normocalórica + suplementação probiótica) quando comparada com uma intervenção dietética isolada (2).

Esses achados, quando comparados ao nosso estudo, revelam que o uso de probióticos quando associados a intervenções dietéticas, podem promover efeitos em relação à redução de gordura corporal, o que não aconteceu em nosso estudo, que apenas avaliamos a dieta.

Sabe-se que as interações entre a MI e o hospedeiro podem ocorrer em muitos níveis, envolvendo vias de sinalização complexas e uma série de biomoléculas derivadas de micróbios que podem impactar locais distais do intestino, como o lipopolissacarídeo (LPS) gerado pela microbiota (35). FABERSANI e colaboradores mostraram efeitos da suplementação contendo a cepa *L. lactis* associada a intervenções dietéticas com restrição calórica em modelo animal. O estudo analisou a composição da microbiota e os parâmetros imunometabólicos e demonstrou que a cepa *L. lactis* possui efeitos potenciais na modulação das alterações imunometabólicas associadas à obesidade (27). Em relação à avaliação das variáveis bioquímicas, não foram encontrados efeitos da suplementação com *L. Lactis*, exceto sobre os níveis de TG, que aumentaram significativamente no grupo tratado com *L. Lactis* (Tabela 4). Contudo, não conseguimos avaliar o metagenoma intestinal dos voluntários para avaliar possíveis efeitos nos parâmetros moleculares.

Um estudo com animais ligeiramente hipertensos mostrou efeito hipotensor e hipolipemiante pelo uso do *L. lactis* (36). Da mesma forma, apesar dos resultados não apresentarem impacto estatístico, BELTRÁN-BARRIENTOS e colaboradores identificaram condição similar em relação às alterações de perfil lipídico utilizando o mesmo suplemento em humanos por oito semanas (37). Outro estudo que combinou as cepas de *L. lactis* e *Bifidobacterium lactis*, mostrou efeitos hipocolesterolêmicos em humanos por oito semanas (38).

Por outro lado, SZULIŃSKA e colaboradores conduziram um estudo de 12 semanas com mulheres obesas na pós-menopausa utilizando um probiótico multiespécies, com diferentes dosagens. Os resultados apontaram uma redução significativa nos níveis de glicose, insulina e Homa-IR, melhora no perfil lipídico, circunferência da cintura e gordura visceral, e

também na concentração de LPS nos grupos suplementados com dosagens baixa ou alta (30). Nosso estudo utilizou apenas a cepa *L. lactis* (LMG 27352) de forma isolada, assim pensamos que a melhora dos parâmetros observados no estudo de SZULIŃSKA possa ser atribuída ao uso de cepas multiespécies.

A literatura tem embasado que há diferenças nas necessidades fisiológicas e nutricionais entre as comunidades bacterianas intestinais, em que certos tipos de dietas podem promover o crescimento de certos membros específicos ou inibir outros (35).

Avaliando o consumo alimentar dos voluntários, foi possível identificar oscilações importantes na alimentação, que possam ter influenciado o crescimento da bactéria *L. Lactis* no intestino. Ambos os grupos modificaram a alimentação ao longo do tempo, e o consumo de carboidratos aumentou significativamente em ambos os grupos. Segundo recomendações vigentes a quantidade de carboidratos deve estar entre 45-65% do total de calorias ingeridas (39). O consumo de lipídios, foi sugestivamente maior no grupo probiótico, apesar de não encontrarmos diferença estatística. A Associação Americana do coração (AHA), recomenda o consumo de lipídeos em torno de 30% ou menos do valor energético total da dieta para indivíduos saudáveis (40). Em relação ao consumo de proteínas, foi observado que alimentação dos voluntários estava hiperprotéica no início, apesar de ambos os grupos terem diminuído seu consumo ao longo da intervenção. As recomendações para o consumo de proteínas sugerem 0,8g/Kg de peso corporal para adultos, correspondendo a um total de 10-35% do valor energético da dieta (37).

Estudos mostram que uma dieta rica em gorduras além de alterar negativamente a MI, promove o aumento de LPS na corrente sanguínea, que aumenta a permeabilidade intestinal, e ocasiona desta forma, a inflamação crônica de baixo grau no hospedeiro (30,35,41). Portanto, a disbiose entérica induzida por dieta pode estar relacionada ao desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina, bem como inflamação local e sistêmica (9).

Em relação ao sódio foi mostrado um aumentado significativo no consumo do eletrólito no grupo probiótico. Sendo a AI (ingestão adequada) de sódio para adultos nesta faixa etária de 1,3-1,5g/dia, para ambos os sexos (42). Estes achados sinalizam um possível aumento no consumo de alimentos industrializados (processados e ultraprocessados) pelos voluntários durante o período da pandemia de COVID-19. Desta forma, foi mostrado os efeitos hipertensivos de dietas com alto teor de sal em modelos animais e humanos, que são mediados por níveis reduzidos do filo *Lactobacillus*, e por subsequentes aumentos nas células T auxiliares 17, pró-inflamatórias (43). Um estudo com animais que receberam dieta controle ou

suplementada com 4% de cloreto de sódio, mostrou nos resultados que as mudanças provocadas na microbiota intestinal pelo consumo de uma dieta rica em sódio agiram induzindo a inflamação intestinal e exacerbação da colite em camundongos (44). Assim, destacamos que o aumento no consumo de sódio na dieta de nossos voluntários possa ter impactado diretamente a microbiota intestinal destes, e influenciado nos efeitos do probiótico na interface intestinal dos mesmos.

Verificando a quantidade de fibras consumida pelos grupos, observamos que nenhum atingiu as necessidades diárias. É sugerida uma ingestão de 38 g/dia de fibras para homens e 25g/dia para mulheres (37). É reconhecido que as fibras prebióticas servem como substratos para a maior parte dos microrganismos que compõem a MI (2). Portanto, os prebióticos são considerados uma ferramenta nutricional que promove a proliferação bacteriana no intestino delgado e induzem a modificação da microbiota e, assim, neutralizam o acúmulo de massa gorda e distúrbios metabólicos relacionados (45).

A literatura tem mostrado que uma dieta rica em gorduras diminui a diversidade de bactérias intestinais, particularmente aquelas envolvidas na produção de AGCCs, enquanto que dietas ricas em fibras têm a capacidade de reverter esse efeito (35). Um estudo de 8 semanas de intervenção utilizando uma dieta com fibras alimentares de centeio, cevada, aveia, frutas, legumes e grãos de soja mostrou nos resultados melhora em uma série de marcadores de risco cardiometabólico em indivíduos com sobrepeso/obesidade (46).

Acreditamos que a baixa ingestão de fibras associada ao alto consumo de gorduras e sódio observada em nosso estudo, possa ter influenciado negativamente nos efeitos da cepa *L. Lactis* sobre as variáveis avaliadas. Entretanto, é importante salientar que a avaliação da ingestão de fibras solúveis foi um fator limitante, pois não obtivemos informações sobre os tipos de fibras consumidas (fermentáveis e não fermentáveis). Analisar o consumo de fibra solúvel seria de grande relevância para nossos resultados, pois a ausência das fibras fermentáveis na dieta pode ter influenciado nos mecanismos de ação do probiótico dificultado seus efeitos.

Dentre as limitações deste estudo destacamos: (i) não avaliação da composição da MI por meio de sequenciamento genético, (ii) não analisada a função imunológica, por meio de dosagens de citocinas séricas e/ou células T efectoras x reguladoras, (iii) não houve controle dietético no consumo dos tipos de fibras exigidos para o crescimento bacteriano, e (iv) o baixo tamanho amostral que pode ter influência na ausência de resultados estaticamente significativos. Podemos inferir que a suplementação com *L. lactis* utilizada neste estudo não

teve efeito modulador sobre os parâmetros de risco cardiometabólicos, antropométricos e de composição corporal em indivíduos com obesidade. Entretanto, é possível que tais resultados poderiam ser promissores usando uma dosagem maior de probióticos, ou da associação de *L. lactis* a outras cepas bacterianas, ou por maior tempo de suplementação e tamanho amostral, ou por intervenções dietéticas, ou ainda, por todos estes fatores agindo de forma conjunta.

**Agradecimentos:** A empresa Coana Importação e Exportação Ltda. Florianópolis-SC, pela doação das cápsulas, a Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura Municipal de Três Corações-MG, que cedeu o espaço e forneceu material para as coletas, a Farmácia de Manipulação Néctar-Três Corações-MG, pela parceria na manipulação das cápsulas, e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo apoio no desenvolvimento do projeto, e aos voluntários pela colaboração.

**Reconhecimentos:** A Tamyres Andréa Chagas Valim, Lara Vilar Fernandes e Yuri Bryann Ribeiro de Oliveira pelo apoio nas coletas e tabulação dos dados. Divulgação: Nenhum conflito de interesse foi declarado neste artigo.

## REFERÊNCIAS

1. Cerdó T, García-Santos JA, Bermúdez MG, Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. *Nutrients*. 2019;11(3):1–31.
2. Gomes AC, de Sousa RGM, Botelho PB, Gomes TLN, Prada PO, Mota JF. The additional effects of a probiotic mix on abdominal adiposity and antioxidant Status: A double-blind, randomized trial. *Obesity*. 2017;25(1):30–8.
3. Brahe LK, Astrup A, Larsen LH. Can we prevent obesity-Related metabolic diseases by dietary modulation of the gut microbiota? *Adv Nutr*. 2016;7(1):90–101.
4. World Health Organization. Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva: World Health Organization; 2000.
5. Haro C, García-Carpintero S, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Landa BB, Clemente JC, et al. Consumption of Two Healthy Dietary Patterns Restored Microbiota Dysbiosis in Obese Patients with Metabolic Dysfunction. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(12):1–9.
6. Lau E, Ferreira-magalh M, Carvalho D, Freitas P. Probiotic Ingestion, Obesity, and Metabolic-Related Disorders: Results from NHANES, 1999–2014. *Nutrients*. 2019;11, 1482:1–12.
7. Noce A, Marrone G, Di Daniele F, Ottaviani E, Jones GW, Bernini R, et al. Impact of gut microbiota composition on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients*. 2019 May 1;11(5).
8. Brusaferrero A, Cozzali R, Orabona C, Biscarini A, Farinelli E, Cavalli E, et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity? *Nutrients*. 2018 Nov 1;10(11).
9. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives. *Curr Obes Rep*. 2019;8(3):317–32.
10. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients*. 2019 Nov 1;11(11).
11. Dao MC, Clément K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *Eur J Intern Med*. 2018 Feb 1;48:18–24.
12. Ding R xue, Goh WR, Wu R na, Yue X qing, Luo X, Khine WWT, et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *J Food Drug Anal*. 2019;27(3):623–31.
13. Kobyliaik N, Virchenko O, Falalyeyeva T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. Vol. 15, *Nutrition Journal*. BioMed Central Ltd.; 2016.
14. de Moraes ACF, da Silva IT, de Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e

- risco cardiometabólico: Mecanismos e modulação dietética. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(4):317–27.
15. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity? *Nutrients.* 2019 Feb 1;11(2).
  16. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019;17(2):333–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
  17. World Health Organization. Physical Status. Use and Anthropometry. World Health Organ Tech Rep Ser; 1995.
  18. World Health Organization. Consultation on Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Heal Organ; 1998.
  19. Cuppari L. Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar Nutrição clínica no Adulto. São Paulo: Manole; 2007.
  20. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. São Paulo: Atheneu; 2008.
  21. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil [Internet]. Vol. 39, Produção da Pecuária Municipal. 2011. 35–340 p. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50002.pdf>
  22. Castro MA De. Manual de críticas de inquéritos alimentares. 2013.
  23. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
  24. Bernini LJ, Simão ANC, Alfieri DF, Lozovoy MAB, Mari NL, de Souza CHB, 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.* 2016;32(6):716–9.
  25. Gomes-Santos AC, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, Cruz DN, et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol.* 2012.
  26. Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros SR, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FG, et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Autoimmun* [Internet]. 2013;40(1):45–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.012>
  27. Fabersani E, Russo M, Marquez A, Abeijón-Mukdsi C, Medina R, Gauffin-Cano P.

- Modulation of intestinal microbiota and immunometabolic parameters by caloric restriction and lactic acid bacteria. *Food Res Int.* 2019;124(June 2018):188–99.
28. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific genera. *Eur J Nutr.* 2020.
  29. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Available from: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)
  30. Szulińska M, Łoniewski I, van Hemert S, Sobieska M, Bogdański P. Dose-dependent effects of multispecies probiotic supplementation on the lipopolysaccharide (LPS) level and cardiometabolic profile in obese postmenopausal women: A 12-week randomized clinical trial. *Nutrients.* 2018;10(6).
  31. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Del Castillo-Codes I, Arraiza-Irigoyen C, Tercero-Lozano M, Camacho J, et al. *Lactobacillus reuteri* v3401 reduces inflammatory biomarkers and modifies the gastrointestinal microbiome in adults with metabolic syndrome: The PROSIR study. *Nutrients.* 2019;11(8):1–14.
  32. Narmaki E, Borazjani M, Ataie-Jafari A, Hariri N, Doost AH, Qorbani M, et al. The combined effects of probiotics and restricted calorie diet on the anthropometric indices, eating behavior, and hormone levels of obese women with food addiction: a randomized clinical trial. *Nutr Neurosci [Internet].* 2020;0(0):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1826763>
  33. Neves AL, Chilloux J, Sarafian MH, Rahim MBA, Boulangé CL, Dumas ME. The microbiome and its pharmacological targets: Therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;25:36–44.
  34. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718–23.
  35. Bohan R, Tianyu X, Tiantian Z, Ruonan F, Hongtao H, Qiong W, et al. Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2019.
  36. Rodríguez-Figueroa JC, González-Córdova AF, Astiazaran-García H, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *J Dairy Sci [Internet].* 2013;96(7):4094–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6014>
  37. Beltrán-Barrientos LM, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A, Torres-Inganzo EH, Astiazarán-García H, Esparza-Romero J, et al. Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure-lowering effect of fermented milk with *Lactococcus lactis*: A pilot study2. *J Dairy Sci [Internet].* 2018;101(4):2819–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13189>



38. Nishiyama K, Kobayashi T, Sato Y, Watanabe Y, Kikuchi R, Kanno R, et al. A double-blind controlled study to evaluate the effects of yogurt enriched with *Lactococcus lactis* 11/19-b1 and *Bifidobacterium lactis* on serum low-density lipoprotein level and antigen-specific interferon- $\gamma$  releasing ability. *Nutrients*. 2018;10(11):1–8.
39. Rosenberg IH, Abrams SA, Beecher GR, Champagne CM, Clydesdale FM, Goldberg JP, et al. Dietary Reference Intakes: Guiding Principles for Nutrition Labeling and Fortification. Vol. 62, *Nutrition Reviews*. 2003. 73–79 p.
40. Waitzberg, D L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009.
41. Sivamaruthi BS, Kesika P, Suganthy N, Chaiyasut C. A Review on Role of Microbiome in Obesity and Antiobesity Properties of Probiotic Supplements. *Biomed Res Int*. 2019.
42. IOM. (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate [Internet]. Book Chapter. 2004. 638 p. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:DIETARY+REFERENCE+INTAKES#5>.
43. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science* (80- ). 2018;362(6416):776–80.
44. Aguiar SLF, Miranda MCG, Guimarães MAF, Santiago HC, Queiroz CP, Cunha P da S, et al. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. *Front Immunol*. 2018;8(JAN):1–12.
45. Duranti S, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. Obesity and microbiota: An example of an intricate relationship. *Genes Nutr*. 2017;12(1):1–15.
46. Marungruang N, Tovar J, Björck I, Hållenius FF. Improvement in cardiometabolic risk markers following a multifunctional diet is associated with gut microbial taxa in healthy overweight and obese subjects. *Eur J Nutr* [Internet]. 2018;57(8):2927–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-017-1563-3>.

## ANEXO

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

**TÍTULO DO ESTUDO: Impacto da suplementação de probióticos nas alterações metabólicas associadas à obesidade.**

**PESQUISADORES:** Andrezza Fernanda Santiago, Universidade Federal de Lavras (UFLA); Camila Maria de Melo, Universidade Federal de Lavras (UFLA); Laura Cristina Jardim Porto Pimenta, Universidade Federal de Lavras (UFLA); Isabela Coelho de Castro, Universidade Federal de Lavras (UFLA); Ana Maria Caetano, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Melissa Aparecida Morais, mestrand- Universidade Federal de Lavras (UFLA); Yuri Bryann Ribeiro de Oliveira, estudante de graduação- Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### **1 - O QUE É ESTE DOCUMENTO?**

Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo que será realizado pela Universidade Federal de Lavras. Este documento é chamado de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e explica este estudo e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também fala os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar, além de dizer os seus direitos como participante de pesquisa. Após analisar as informações deste Termo de Consentimento e esclarecer todas as suas dúvidas, você terá o conhecimento necessário para tomar uma decisão sobre sua participação ou não neste estudo. Não tenha pressa para decidir. Se for preciso, leve para a casa e leia este documento com os seus familiares ou outras pessoas que são de sua confiança.

#### **2 - POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?**

O objetivo deste trabalho é identificar uma nova estratégia preventiva e/ou terapêutica para as alterações metabólicas associadas à obesidade, com o uso de probióticos como suplemento alimentar e verificar seus resultados. Onde o uso dos mesmos pode vir a contribuir para a implementação de novas estratégias e ou/ recomendações dietéticas para tentar reverter a incidência do aparecimento das comorbidades associadas à obesidade atualmente.

#### **3 - O QUE ESTE ESTUDO QUER SABER?**

O presente projeto visa estudar os efeitos terapêuticos e moduladores da administração do uso do probiótico *Lactococcus lactis* no tratamento de alterações metabólicas associadas à obesidade, como os fatores envolvidos na síndrome metabólica.

#### **4 - O QUE ACONTECERÁ COMIGO DURANTE O ESTUDO?**

Será realizada a avaliação da composição corporal através da aferição de peso, altura, IMC, circunferências de cintura e quadril e BIA (método bioimpedância elétrica) para estimar a massa muscular e adiposa. Serão solicitados os exames bioquímicos de critério do estudo, hemograma, glicemia de jejum, e insulina (para cálculo do Índice Roma), colesterol total e frações, triglicérides, hemoglobina glicada e TGO, TGP e GGT. Também será pedido para ser respondido um questionário de frequência alimentar e será feito o recordatório alimentar a cada avaliação do voluntário, a fim de conhecer melhor a alimentação destes. Serão entregues aos

voluntários cápsulas contendo o probiótico ou placebo, que deverão ser utilizadas por aproximadamente 03 meses, tempo total do estudo. As cápsulas de placebo serão compostas por celulose, uma fibra insolúvel encontrada nos vegetais, inerte à saúde humana. O uso do placebo se justifica para avaliar o real efeito do probiótico.

#### **5 - HAVERÁ ALGUM RISCO OU DESCONFORTO SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Os riscos que serão submetidos são relacionados às coletas dos dados como dor ou hematoma após coletar sangue ou constrangimento ao ser avaliado para aferir as medidas corporais. Para minimizar possíveis desconfortos e riscos, os pesquisadores responsáveis pela coleta de sangue serão obrigatoriamente treinados e vestirão jalecos e luvas (descartáveis). Todo material utilizado será estéril. Em relação aos desconfortos, pediremos sua autorização para cada aferição antropométrica e questionário aplicado, bem como estaremos esclarecendo a necessidade e importância de cada passo dado no projeto. Para evitar a ocorrência de hematomas após coleta de sangue serão passadas algumas orientações como: não se movimentar muito durante a coleta de sangue para evitar qualquer erro no momento da punção; não é recomendável massagear o local da picada, pois ao invés de ajudar a diminuir o desconforto, irá facilitar o surgimento de hematomas na região; pressionar por alguns minutos o local perfurado e, caso a coleta de sangue tenha sido na dobra do braço, é recomendável não flexioná-lo. Em relação ao risco com o uso de probióticos, em alguns casos pode ocorrer alteração da função intestinal como constipação ou diarreia, que poderá ser corrigido através de orientação alimentar.

#### **6 - HAVERÁ ALGUM BENEFÍCIO PARA MIM SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Sim, pois com o uso do probiótico e possível modulação da microbiota intestinal poderão de obtidos resultados satisfatórios tanto no controle de peso ou das comorbidades associadas à obesidade. Vários estudos reportam que a manipulação da microbiota pode influenciar no ganho ou perda de peso e na modulação das alterações metabólicas e imunológicas associadas à obesidade. Acreditamos que o desenvolvimento de tratamentos profiláticos e terapêuticos para essa doença, que não apresentem efeitos colaterais (como o que estamos propondo nesse projeto), seja de grande importância em termos de saúde pública. Assim, acreditamos que o desenvolvimento desse projeto pode ter um impacto importante em médio prazo em um problema grave de saúde pública recente no país.

#### **7 - QUAIS SÃO AS OUTRAS OPÇÕES SE EU NÃO PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Não participar do estudo.

#### **8 - HAVERÁ ALGUM CUSTO PARA OS PARTICIPANTES?**

Não haverá nenhum custo para os participantes da pesquisa.

#### **9 - HÁ PREVISÃO DE RESSARCIMENTO DE GASTOS?**

A participação nesta pesquisa não gera gastos para os voluntários. O participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário caso seja comprovado danos decorrentes da pesquisa. Caso haja algum gasto por parte dos voluntários, o ressarcimento será realizado de acordo com a resolução CNS 466/12.

#### **10 - A PESQUISA PODE SER SUSPensa?**

O estudo somente poderá ser suspenso após a anuência do CEP e/ou da CONEP (se for o caso) que aprovou a realização da pesquisa, a menos que o encerramento se dê por razões de segurança. Nesse caso, o estudo poderá ser descontinuado sem prévia análise do CEP. Contudo, o pesquisador deve notificar o CEP e/ou a CONEP sobre a suspensão definitiva do estudo.

### **11 - QUAIS OS CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA?**

Não há riscos previsíveis para a suspensão da pesquisa e a mesma será encerrada quando as informações necessárias forem obtidas.

### **12 - QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS SE EU QUISER PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Você tem direito a:

- 1) Receber as informações do estudo de forma clara;
- 2) Ter oportunidade de esclarecer todas as suas dúvidas;
- 3) Ter o tempo que for necessário para decidir se quer ou não participar do estudo;
- 4) Ter liberdade para recusar a participação no estudo, e isto não trará qualquer problema para você;
- 5) Ter liberdade para desistir e se retirar do estudo a qualquer momento;
- 6) Ter assistência a tudo o que for necessário se ocorrer algum dano decorrente do estudo, de forma gratuita, pelo tempo que for preciso;
- 7) Ter direito a reclamar indenização se ocorrer algum dano decorrente do estudo;
- 8) Ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo, se for o caso;
- 9) Ter respeitado o seu anonimato (confidencialidade);
- 10) Ter respeitada a sua vida privada (privacidade);
- 11) Receber uma via deste documento, assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador;
- 12) Ter liberdade para não responder perguntas que incomodem você.

### **13 - O QUE ACONTECERÁ COM O MATERIAL QUE FOR COLETADO DE MIM?**

O material coletado, no caso sangue, será utilizado para avaliar os exames bioquímicos mencionados acima, como complemento do estudo para avaliação do mesmo. Não será armazenado nenhum material coletado para outros fins.

### **14 - SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE OS MEUS DIREITOS OU QUISER FAZER UMA RECLAMAÇÃO, COM QUEM EU FALO?**

Fale diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Lavras. Este comitê é formado por pessoas que analisam a parte ética dos estudos e autorizam ele acontecer ou não. Você pode entrar em contato com este Comitê por telefone (35) 2142-2176, email: [comissao@etica.ufla.br](mailto:comissao@etica.ufla.br) ou carta: Universidade Federal de Lavras, Comissão de Ética, Prédio da Reitoria – Campus Universitário, Caixa Postal 3037 – CEP 37200-000 – Lavras MG ou pessoalmente.

### **15 - SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE O ESTUDO, COM QUEM EU FALO?**

Fale diretamente com o pesquisador responsável. Nome do pesquisador: Andrezza Fernanda Santiago. Formas de contato: tel: (35) 38299781; email: andrezza.santiago@dnu.ufla.br.

### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém leu para mim. Tive o tempo necessário para pensar, fazer perguntas e falar a respeito do estudo com outras pessoas. Autorizo a minha participação na pesquisa. Ao assinar este Termo de Consentimento, não abro mão de nenhum dos meus direitos. Este documento será assinado por mim e pelo pesquisador, sendo todas as páginas rubricadas por nós dois. Uma via ficará comigo, e outra com o pesquisador.

### **CAMPO DE ASSINATURA**

Nome por extenso do participante da pesquisa representante legal	Data	Assinatura

Nome por extenso do pesquisador	Data	Assinatura

Nome por extenso da testemunha imparcial (casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência visual)	Data	Assinatura

---

Universidade Federal de Lavras – Departamento de Nutrição

Av. Norte UFLA – Aqueça Sol, Lavras-MG, CEP 37200 000 Telefone: (35) 3829-4692

---