

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

Efeito do consumo de *kefir* sobre doenças crônicas inflamatórias: obesidade e desordens metabólicas associadas

Micaela Gonçalves Vivan

Pelotas, 2016

Micaela Gonçalves Vivan

**Efeito do consumo de *kefir* sobre doenças crônicas inflamatórias:
obesidade e desordens metabólicas associadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Rúbia Duarte Buchweitz

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Castilhos Barros

Pelotas, 2016

Agradecimentos

À Deus, por iluminar meus passos com sabedoria e força para enfrentar os desafios encontrados ao longo da caminhada.

À meus pais Ildo, Clair, e meu irmão Julian, incansáveis no amor, confiança e apoio. Pelos exemplos de humanidade, integridade, dedicação e grandeza. Por terem sido mestres da compreensão e da paciência nos dias mais difíceis. Pela honra de poder chamá-los de família e tê-los ao meu lado.

À meus amigos, de ontem, hoje, e sempre, por serem a força que impulsiona minha evolução e o carinho que conforta em meio à correria. Grata pelo privilégio de carregar um pouco de cada um em meu crescimento pessoal e profissional.

À meus colegas tanto de mestrado, como dos Laboratórios de Nutrição Experimental e Nutrifisiogenômica, especialmente à amiga e professora MSc. Thais Marten, pela parceria incondicional e pelo tempo despendido aos ensinamentos.

À Universidade Federal de Pelotas, especialmente à Faculdade de Nutrição, meus sinceros agradecimentos pelos 6 anos de acolhida nessa jornada de graduação e mestrado.

Aos corpos docente e discente desta instituição, meus professores orientadores, Dra. Márcia Rúbia Duarte Buchweitz e Dr. Carlos Castilhos de Barros, e demais colaboradores no presente trabalho, pela formação de qualidade a qual tive acesso, por toda retaguarda e por seu papel fundamental em meu desenvolvimento profissional.

Obrigada, muitíssimo obrigada!

Resumo

VIVAN, Micaela Gonçalves. **Efeito do consumo de *kefir* sobre doenças crônicas inflamatórias: obesidade e desordens metabólicas associadas.** 2016. XXf. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

A obesidade está entre as doenças crônicas não transmissíveis que mais crescem no mundo e pode ser precursora de desordens metabólicas importantes, como Diabetes Mellitus tipo 2, dislipidemias e doenças cardiovasculares. Um mecanismo fisiopatológico unificador destes fenômenos surgiu com o conceito de “meta-inflamação” - associação entre o consumo excessivo de nutrientes e a desregulação de mediadores da imunidade e da inflamação, provocando uma resposta crônica, específica e de baixo grau, com consequências sistêmicas ao indivíduo. A microbiota intestinal de indivíduos obesos apresenta uma população em desequilíbrio, e com maior capacidade de resgate metabólico de energia da dieta, podendo ocasionar a “meta-inflamação”. O *kefir* é um alimento probiótico, cujos grãos são estruturas complexas de associação simbiótica entre leveduras e bactérias, envoltas por uma matriz de polissacarídeos. Os benefícios do consumo de *kefir* como parte da dieta são demonstrados por inúmeras evidências e sua eficácia terapêutica como alimento probiótico atravessa a modulação da microbiota intestinal e do sistema imunológico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo de *kefir* sobre a obesidade e desordens metabólicas associadas a ela. Foram utilizados 32 ratos Wistar divididos em quatro grupos: dieta padrão + solução salina (DPS), dieta padrão + *kefir* (DPK), dieta de cafeteria + solução salina (DCS), e dieta de cafeteria + *kefir* (DCK). Foram analisadas ingestão calórica, variação da massa corporal, curvas de glicemia (glicose, insulina), e peso dos tecidos (fígado, coração, tecido adiposo e músculo). No presente estudo, o consumo de *kefir* foi capaz de reduzir a massa corporal (NDS 118,5±1,38; CDS 138,7±2,66; NDK 109,0±1,63; CDK 120,9±2,96, p<0,001) e de tecidos como fígado (NDS 23,0±0,99; CDS 26,8±0,49; NDK 21,5±0,66; CDK 25,5±0,54; p <0,001), coração (NDS 1,43±0,06; CDS 1,53±0,03; NDK 1,36±0,03; CDK 1,40±0,03; p=0,02) e tecido adiposo (NDS 16,7±1,79; CDS 38,3±6,75; NDK 14,5±1,71; CDK 23,4±2,41; p=0,04). Além disso, observou-se um aumento na massa muscular (NDS 5,50±0,42; CDS 5,42±0,31; NDK 5,96±0,42; CDK 7,44±0,52; p=0,02), não foi observada relação entre o consumo de *kefir* e variações na ingestão de alimentar. Outras análises devem ser realizadas a fim de verificar mais profundamente os benefícios do consumo de *kefir* como parte de uma dieta.

Palavras-chave: obesidade; meta-inflamação; probióticos; *kefir*

Abstract

VIVAN, Micaela Gonçalves. **Effect of *kefir* consumption on chronic inflammatory diseases: obesity and associated metabolic disorders.** 2016. XXf. Dissertation (Master's Degree) – Post Graduation Program in Food and Nutrition. Federal University of Pelotas, Pelotas/RS.

Obesity is among the fastest growing chronic diseases in the world and can be a precursor to important metabolic disorders such as type 2 diabetes, dyslipidemia and cardiovascular diseases. A unifying pathophysiological mechanism for this phenomenon came up with the concept of "meta-inflammation" - association between excessive nutrient consumption and deregulated immunity and inflammation mediators, causing a chronic, specific and low-grade response, with systemic consequences to individuals. The colonizing gut microbiota in human host can manifest important metabolic and immunological functions. Intestinal microbiota of obese individuals presents itself in disbiotic and with greater capability of dietary energy metabolic rescue, which may cause the "meta-inflammation". Kefir is a probiotic food, the grains are complex structures of symbiotic association between yeast and bacteria, surrounded by a polysaccharide matrix. The benefits of kefir consumption as part of a diet are demonstrated by several evidences and their therapeutic efficacy as a probiotic food goes through the modulation of the gut microbiota and the immune system. The aim of this study was to evaluate the effect of kefir consumption on obesity and metabolic disorders associated with it. 32 Wistar rats were divided into four groups: standard + saline diet (DPS), cafeteria diet + saline (DCS) standard + kefir diet (DPK) and cafeteria diet + kefir (DCK). Food intake, body mass changes, blood glucose curves (glucose, insulin) and tissue masses were analyzed. In this study *kefir* was able to reduce body mass (NDS 118.5±1.38; CDS 138.7±2.66; NDK 109.0±1.63; CDK 120.9±2.96 , p<0.001) and tissue masses, such as liver (NDS 23.0±0.99; CDS 26.8±0.49; NDK 21.5±0.66; CDK 25.5±0.54; p<0.001), heart (NDS 1.43±0.06; CDS 1.53±0.03; NDK 1.36±0.03; CDK 1.40±0.03; p=0.02) and adipose tissue (NDS 16.7±1.79; CDS 38.3±6.75; NDK 14.5±1.71; CDK 23.4±2.41; p=0.04) masses. In addition, it was observed an increase in muscle mass (NDS 5.50±0.42; CDS 5.42±0.31; NDK 5.96±0.42; CDK 7.44±0.52; p=0.02), and no relation between *kefir* intake and food intake variations. Further analyses must be conducted in order to verify the profound benefits of kefir consumption as part of a diet.

Keywords: obesity; meta-inflammation; probiotics; *kefir*

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de Variâncias
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
DC	Dieta de Cafeteria
DCK	Dieta de Cafeteria com <i>Kefir</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Dieta Padrão
DPK	Dieta Padrão com <i>Kefir</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FIAF	Fasting Induced Adipose Factor
HAS	Hispertensão Arterial Sistêmica
HDL	Colesterol de Alta Densidade
HPA	Hipotalâmico-Pituitária-Adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Colesterol de Baixa Densidade
LPL	Lipase Lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCK	Proteína Quinase
PCR	Proteína C-Reativa
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico

SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SNC	Sistema Nervoso Central
TG	Triglicerídeos
TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
VIGITEL	Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Colesterol de Muito Baixa Densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1 Revisão de Literatura.....	8
Doenças Crônicas Não Transmissíveis.....	8
Meta-Inflamação.....	10
Probióticos.....	14
<i>Kefir</i>	17
2 Artigo.....	20
3 Referências.....	31
Anexos.....	39

1 Revisão de Literatura

O cenário nutricional da população brasileira nas últimas décadas tem retratado importantes mudanças em seu padrão alimentar. A inversão entre tendências marcantes do estado nutricional, caracterizada pelo declínio nos índices de ocorrência da desnutrição de maneira intensa e o aumento das prevalências de sobrepeso e obesidade, embora os agravos ainda co-existam, definem a chamada transição nutricional do país (BATISTA FILHO, 2007).

O estilo de vida “ocidentalizado”, que tem como principais características sedentarismo, alto consumo de alimentos ricos em gorduras, açúcares refinados (principalmente em bebidas) sal, carne vermelha, embutidos, cereais refinados e produtos ultraprocessados (*fast foods*, alimentos rápidos e prontos para consumo), são descritos na literatura como a maior causa da epidemia de obesidade, que ganha cada vez mais magnitude (SHOELSON et al., 2007; TILG et al., 2009; MOZAFFARIAN et al., 2011).

Doenças Crônicas Não Transmissíveis

A obesidade está entre as doenças crônicas não transmissíveis que mais crescem no mundo (PISTELLI & COSTA, 2010). Dados atuais da Organização Mundial da Saúde (2015) demonstram que 13% dos adultos de todo mundo com idades de 18 anos ou mais, estão obesos e 39% estão acima do peso. No Brasil, em 2008-2009, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (IBGE, 2010), as prevalências de sobrepeso e obesidade já atingiam, respectivamente, 49,9% e 14,8% em adultos nessa mesma faixa de idade, 20,5% e 4,9% em adolescentes de 10 a 19 anos, e 34,8% e 16,6% em crianças entre 5 e 9 anos.

O termo obesidade foi definido pela Organização Mundial da Saúde, em 1995, como um grau de armazenamento anormal ou excessivo de gordura corporal, associado a várias complicações metabólicas, constituindo assim um sério risco para a saúde da população. O processo que leva à doença tem princípio no desequilíbrio do balanço energético. O balanço energético reflete a diferença entre a quantidade de energia consumida e a quantidade de energia gasta tanto em funções vitais como para atividades em geral. Esse balanço é

classificado com positivo e indesejável, quando a quantidade de energia consumida é maior do que a quantidade gasta pelo indivíduo (BRASIL, 2006).

Igualmente, ou ainda mais importante, ao risco ocasionado pelo excesso de massa corporal, está aquele relacionado à distribuição da gordura corporal. Indivíduos com circunferência abdominal acima do padrão adequado, apresentam excesso de tecido adiposo visceral, seriamente associado a distúrbios metabólicos (BRASIL, 2006). Segundo a OMS (WHO, 2000), os pontos de corte para circunferência abdominal (cm) associada à obesidade e risco de distúrbios metabólicos em homens e mulheres caucasianos, respectivamente são, $\geq 94\text{cm}$ e $\geq 80\text{cm}$, considerando-se um risco aumentado, e, $\geq 102\text{cm}$ e $\geq 88\text{cm}$ para risco substancialmente aumentado.

A obesidade é atualmente considerada como um sério problema de saúde pública, pois detém enorme relevância sobre o aumento das taxas de mortalidade do país, e também está associada à incidência de uma série de doenças metabólicas que incluem o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemias, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, distúrbios músculo-esqueléticos e até mesmo de neoplasias (SHOELSON et al., 2007; MOZAFFARIAN et al., 2011).

O DM2 é ocasionado por deficiências na sinalização e ação da insulina, hormônio responsável por adequado controle da síntese de glicose no fígado e promoção da captação de glicose pelo músculo esquelético. Em geral, o nível do acúmulo de gordura corporal é proporcional ao grau de resistência à insulina. A resposta biológica de indivíduos obesos a concentrações normais de insulina é menor, isso ocorre em consequência a falhas de sinalização e ação do hormônio, que podem ser atribuídas tanto a uma redução em número ou afinidade de receptores da insulina nos tecidos, como redução na quantidade e translocação de GLUT4, transportador de glicose transmembrana. Desta maneira, é possível afirmar que esses indivíduos apresentam altos níveis de insulina sérica, o que provoca o desenvolvimento da DM2 (GLEW & CRABB, 2007).

Estimativas recentes da Federação Internacional do Diabetes (2013), indicam que em torno de 382 milhões de pessoas no mundo sofrem da doença, e 5,1 milhões de pessoas morreram por complicações dessa patologia. As

projeções são de que em 2035, o número esperado de portadores dessa doença seja de 471 milhões, e com estimativa de aumento para 592 milhões de pessoas em 2038. Dentre esses números, a prevalência de DM2 é de, aproximadamente, 85% a 95% da população.

No Brasil, a Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2014) encontrou, dentre a população adulta de 27 cidades estudadas, uma frequência de diagnóstico médico prévio para diabetes de 6,9%. Com o avanço da idade as prevalências chegaram a mais de 20%.

A DM2 tem origem em múltiplos fatores de risco, com base principal nos estilos de vida não saudáveis, assim como a obesidade e as dislipidemias. Hábitos alimentares inadequados, caracterizados por dietas abundantes em lipídeos e carboidratos, aliados ao sedentarismo, promovem uma absorção energética superior às necessidades do organismo. Essa energia extraída em demasia provoca um aumento da lipogênese no fígado e da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, tanto circulantes, como armazenados no fígado e tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2006).

Esse processo induz alterações nas lipoproteínas circulantes, classificadas em: lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (HOTAMISLIGIL, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

Segundo dados do VIGITEL (2014), a prevalência de dislipidemias por diagnóstico médico prévio na população adulta das 27 cidades estudadas no Brasil, foi de 20,3%. Com o avanço da idade, o diagnóstico tornou-se mais comum e chegou a atingir 36,6% da população idosa, com 65 anos ou mais.

Meta-Inflamação

O conceito de “meta-inflamação” relaciona o consumo excessivo de nutrientes, característico do perfil obesogênico, com a desregulação de mediadores celulares e moleculares da imunidade e da inflamação, induzindo uma resposta inflamatória crônica à obesidade e efeitos sistêmicos adversos no organismo. Esta natureza crônica da meta-inflamação é caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta imune celular específica e de baixo grau, que afeta os índices do estado estacionário da homeostase metabólica ao longo do tempo (HOTAMISLIGIL, 2006; KOSTELI et al., 2010).

A resposta imuno-inflamatória objetiva reestabelecer o funcionamento do organismo de volta a seu estado de equilíbrio, quando estimulada pela obesidade compreende uma série de fatores característicos à resposta inflamatória clássica, tais como o aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e da liberação de mediadores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias e proteína C-reativa), e outras particularidades em alguns aspectos que distinguem a “meta-inflamação” (BLACKBURN et al., 2006; ALIPOUR et al., 2007; KOSTELI et al., 2010).

Essa inflamação crônica de baixo grau envolve mecanismos pelos quais estes mediadores pró-inflamatórios são capazes de provocar ativação, a longo prazo, do sistema imune inato, que incluem o aumento de citocinas circulantes, diminuição dos fatores de proteção, como a adiponectina, e comunicação entre as células inflamatórias e metabólicas, consequentemente causando uma diminuição da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (LAHOZA & MOSTAZAA, 2007).

O tecido adiposo branco, é considerado atualmente como um importante órgão endócrino metabolicamente ativo, composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, monócitos e macrófagos. Na obesidade se verifica hipertrofia como proliferação dos adipócitos, fenômenos estes que causam compressão dos vasos sanguíneos irrigadores do tecido, reduzindo a chegada de oxigênio às células, de maneira a causar a morte de alguns adipócitos (GOOSSENS, 2008; BAYS et al, 2008; WOOD et al., 2009).

Com o objetivo de reverter a chamada hipoxia, ao buscar o aumento da angiogênese e do fluxo sanguíneo para o tecido, é estimulada a cascata inflamatória com expressão e/ou síntese de uma série de substâncias bioativas de ação local ou sistêmica: as adipocinas, que são as citocinas pró-inflamatórias como a leptina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), e as proteínas de fase aguda, dentre elas a proteína C-reativa (PCR), e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (NEELS & OLEFSKY, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006).

No que tange à PCR, segundo estudos realizados no Brasil, tanto em crianças e adolescentes (BRASIL et al., 2007), quanto com pessoas idosas (SASAKI et al., 2007), foram observados níveis de PCR significativamente

maiores, respectivamente, em IMC elevados (obesos), e em alta concentração de adiposidade abdominal.

Já a MCP-1, sintetizada pela própria população de macrófagos residente no tecido adiposo, é responsável pelo aumento da captação de monócitos na corrente sanguínea, fazendo com que estes infiltram o tecido adiposo em grandes proporções, e transformem-se igualmente em macrófagos. Além disso, pela plasticidade no contato célula a célula, diante da conversão dos pré-adipócitos (que possuem perfil mais semelhante aos macrófagos do que aos adipócitos), ocorre uma aquisição por parte dos pré-adipócitos, das funções características aos macrófagos como capacidade fagocítica, propriedades antigênicas e atuação como apresentadoras de antígeno (KANDA et al., 2006; TILG & MOSCHEN, 2006; WOOD et al., 2009).

Em 2005, Cancello et al., observaram os percentuais de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos sem e com obesidade, e verificaram, respectivamente, valores de $1,4\% \pm 0,6\%$ e $22,6\% \pm 4,3\%$. Contudo, esse número pode chegar a 60% em casos de obesidade mórbida.

A leptina, sintetizada e concentrada em nível sérico de maneira proporcional à massa de tecido adiposo, é um hormônio sinalizador, que informa ao cérebro sobre os estoques de energia do corpo. Portanto, em uma fisiologia normal, níveis elevados de leptina informam ao cérebro sobre excesso de tecido adiposo, e em resposta à essa sinalização ocorre o desenvolvimento da sensação de saciedade, com consequente atenuação da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (ANTUNA-PUENTE et al., 2008; FERNANDEZ-RIEJOS et al., 2010).

Em alguns casos, a obesidade pode ser causada pela deficiência ou mutação do gene expressor da leptina. Porém, mais comumente observada na obesidade está a hiperleptinemia. Quando o mecanismo de sinalização da leptina no sistema nervoso central (SNC) falha, o controle adequado do armazenamento de gordura corporal fica prejudicado (LAU et al., 2005; TRAYHURN et al., 2006).

O que ocorre é a existência de receptores da leptina no sistema nervoso central (SNC) e nas células do sistema imunológico. Em nível hipotalâmico, o efeito da leptina no SNC estimula uma ativação crônica, inata, do sistema imunológico, acarretando a proliferação de células linfocitárias T pró-

inflamatórias. A ação direta da leptina não somente descreve uma resposta adaptativa do hormônio ao aumento da competência imune do organismo, ocasionando resistência à ação desse hormônio, como também, ao ter sua expressão intensificada ainda em resposta à hipóxia das células adiposas, favorece a produção de citocinas pelos macrófagos (PARACCHINI et al., 2005; YANG & BAROUCH, 2007).

O TNF- α é uma dessas citocinas pró-inflamatórias em que a hiperprodução está diretamente relacionadas tanto à hipertrofia do tecido adiposo como à infiltração de macrófagos nesse tecido. Independentemente do mecanismo que causa o aumento da síntese de TNF- α , diversos estudos evidenciaram que a citocina parece ter papel importante na fisiopatologia da resistência à insulina e DM2, prejudicando a sinalização do hormônio insulínico, com redução da síntese e alteração da expressão gênica dos transportadores da glicose, e consequente, diminuição da sua captação e armazenamento (VOLP et al., 2008; ARSLAN et al., 2010; GALIC et al., 2010).

Além disso, o TNF- α também é capaz de inibir a lipogênese, e de aumentar da lipólise. Esse fenômeno provoca o acúmulo de triacilglicerois, conhecidos por sua eficiência em ativar a proteína quinase C (PKC). Por sua vez, a PKC é responsável por uma série de funções como permeabilidade e contratilidade vascular, e sinalização para citocinas e hormônios. Sua elevação pode levar a alterações inflamatórias no tecido vascular, ocasionando complicações sérias como Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e doenças cardiovasculares (DCV) (DESPRESS & LEMIEUX, 2006; ANTUNA-PUENTE et al., 2008; GALIC et al., 2010).

Estudos já demonstraram uma maior expressão gênica do TNF- α no tecido adiposo de indivíduos obesos, quando comparados àqueles eutróficos (DANDONA et al., 1998; BERTIN, et al., 2000; PRADO, 2007). Os achados de Silveira et al. (2009) ratificam essa informação ao evidenciarem índices aumentados de leptina e TNF- α em indivíduos obesos e sua associação com a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6.

A IL-6 pode agir de formas distintas, dependendo da sua concentração orgânica em tecidos periféricos e no SNC. Quando exacerbada, pode induzir a uma hiperlipidemia por estimular a lipólise e a síntese hepática de lipídeos, hiperglicemias e resistência insulínica, similarmente ao TNF- α . Ainda a IL-6

encontrada no SNC, impulsiona a ação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), associado a homeostase energética, obesidade, HAS e resistência à insulina (BERG & SCHERER, 2005; GUIMARÃES et al., 2007).

Porém, ressalta-se que as adipocinas secretadas pelos adipócitos não são exclusivamente disparadoras do processo inflamatório. A adiponectina, por exemplo, possui efeito contrário, e é considerada, portanto, como uma substância bioativa protetora contra obesidade, DM2 e DCV. Ela atua no fígado, nos músculos e até mesmo nos tecidos vasculares. Promove a oxidação de ácidos graxos livres, aumenta a sensibilidade à insulina e a captação de glicose. Os níveis séricos de adiponectina em indivíduos obesos se apresentam substancialmente reduzidos (ANDERSSON et al., 2008; LEITE et al., 2009; OLIVEIRA & BRESSAN, 2010)

Diferenças entre os índices de adiponectina foram verificados por Nakamura et al. (2008), ao compararem japoneses que viviam no Japão à japoneses morando no Havaí, com um estilo de vida ocidentalizado. Os primeiros, apresentaram concentrações altas de adiponectina sérica. As diferenças encontradas estenderam-se ao IMC desses indivíduos, desenhando uma tendência inversamente proporcional entre IMC elevado e concentrações baixas de adiponectina.

Probióticos

Nos últimos anos tem-se observado uma estreita relação entre a microbiota colonizadora do intestino hospedeiro e a obesidade, doenças metabólicas e imuno-inflamatórias. A disbiose, que é o desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, ocorre em indivíduos obesos, os quais parecem reunir uma população de micro-organismos com maior capacidade de resgate metabólico de energia fornecida pela dieta e está diretamente relacionada à manifestação da resposta inflamatória crônica de baixo grau que é característica da obesidade (LEY, 2010; KNIGHTS et al., 2013).

A microbiota intestinal consiste de um grande número de micro-organismos que ocupam o intestino do hospedeiro humano, e é composta predominantemente por dois filos: *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Na obesidade, há redução da diversidade de bactérias benéficas colonizadoras em geral, e também há um importante desequilíbrio entre espécies pertencentes aos

principais filos, com a presença em maior abundância de *Firmicutes* e a redução significativa de *Bacteroidetes* (ANGELAKIS et al., 2012; SWEENEY & MORTON, 2013; VERDAM et al., 2013).

Por estar envolvida em diversas funções, incluindo a degradação de polissacarídeos não digeríveis pelo hospedeiro, a microbiota intestinal promove o resgate metabólico de energia. Em geral, apesar da composição da dieta do adulto ser extremamente variável entre refeições e dias, a longo prazo, os indivíduos conseguem compensar o acúmulo de energia com o que é gasto em suas atividades e esse balanço energético é chamado de homeostase. Porém, qualquer ingestão excessiva de energia, menor até que 1%, comparada ao que é gasto, ao longo do tempo pode levar ao aumento da deposição de gordura corporal, levando à obesidade (HILL, 2006; SILVA et al., 2013).

Assim, ressalta-se a importância de todos os mecanismos que possam influenciar na manutenção da homeostase energética, como o resgate metabólico de energia. Desde 2004, Backhed et al., já evidenciavam em seu experimento com camundongos *germ-free* (sem microbiota), criados em ambiente estéril, que esses animais apresentavam 40% menos de gordura corporal total, mesmo consumindo 30% mais de energia, quando comparados a camundongos com uma microbiota normal.

Segundo Jumpertz et al. (2011), a proporção de energia recuperada da alimentação está relacionada à disbiose entre microorganismos *Firmicutes* que estão presentes em maior quantidade, e *Bacteroidetes*. Os resultados encontrados por Ley et al. (2005), ao investigar a microbiota de camundongos ob/ob (geneticamente), corroboram com essa informação, pois foi encontrado um déficit de 50% no filo *Bacteroidetes* dos animais obesos, com aumento proporcional na concentração de *Firmicutes*, quando comparados a seus pares eutróficos, expostos à mesma dieta.

Com o aumento da extração de energia via intestino, pela associação de fatores característicos ao perfil obesogênico, há a estimulação da lipogênese e então, da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos circulantes. Esse fenômeno causa a potencialização da atividade da lipase lipoproteica (LPL) capaz de covertê-los à forma armazenada no fígado, músculos e tecido adiposo (RODRIGUES, 2011).

Ao mesmo tempo, somado a este aumento da atividade da LPL, Rodrigues (2011), sugeriu que a microbiota intestinal tem revelado a capacidade de inibição à síntese do *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAF) no intestino, que é responsável por regular a atividade da LPL. Ao comparar animais germ free e com microbiota, ele mostrou que além dos níveis de FIAF apresentarem-se menores nos animais com microbiota, essa alteração era acompanhada por aumento de peso, glicemia e resistência à insulina. Tais mecanismos contribuem para inibição da lipólise e diferenciação dos adipócitos com consequente expansão do tecido adiposo, precursor da resposta imuno-inflamatória de baixo grau.

Em contrapartida, quando há o aumento da concentração de bactérias gram-negativas que possuem como componente de sua membrana lipopolissacarideos (LPS) e acarretam em uma maior absorção dessa substância, promove um quadro de endotoxemia metabólica. Ao ligar-se aos receptores das células imunes inatas (CD14 - *cluster of differentiation 14* e TLR4 - *toll like receptor 4*), os LPS estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, relacionadas à resposta imuno-inflamatória da obesidade e distúrbios metabólicos associados. Portanto, de maneira geral, o equilíbrio da microbiota intestinal é indispensável na manutenção da homeostase e saúde humana (SILVA et al., 2013).

Diante ao exposto, sobre o aumento do número absoluto da população de microorganismos do filo *Firmicutes* na microbiota intestinal de indivíduos obesos, e sua importante função no resgate metabólico de energia (LEY et al., 2005; 2006), é importante acrescentar que há muito tempo foi postulada por Metchnikoff (1908) a informação de que alguns micro-organismos pertencentes a este filo possuem propriedades funcionais no hospedeiro humano. Dentre os principais microorganismos com potencial probiótico estão os da espécie *Lactobacillus*, relacionados intimamente ao processo de modulação imunológica e atenuação de respostas inflamatórias (NG et al., 2009; ENGE et al., 2011).

A colonização intestinal por bactérias funcionais é capaz de manipular o sistema imunológico da mucosa do hospedeiro, normalizando a morfologia do sistema imune e o balanço imunológico por meio da secreção de

imunomoduladores que agem sobre as vias de sinalização dessas células imunológicas (LEBEER et al, 2008; HEMAISWARYA et al, 2013).

Neste âmbito da promoção essencial do equilíbrio da microbiota intestinal, as intervenções microbiológicas oriundas de probióticos tem se tornado cada vez mais relevantes (VANDENPLAS et al., 2015). Probióticos são aqueles micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Evidências científicas têm demonstrado o efeito positivo do consumo de probióticos no combate à obesidade. Em modelos animais a ingestão de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus sakei* (JI et al., 2012), *Lactobacillus rhamnosus* (LEE et al., 2006) e *Lactobacillus plantarum* (TAKEMURA et al., 2010) causou, respectivamente, uma redução significativa do tecido adiposo e de marcadores inflamatórios relacionados à obesidade, redução do peso corporal e também do tecido adiposo, redução do tamanho das células adiposas, do tecido adiposo branco e do colesterol total sérico.

Estudos científicos envolvendo a administração de probióticos em grupos de risco como bombeiros, policiais, enfermeiros, expostos a situações de estresse (GUILLEMARD et al., 2010a), estudantes universitários (SMITH et al., 2012), idosos (GUILLEMARD et al., 2010b) e crianças (MERENSTEIN et al., 2010), verificaram diminuição significativa em números e duração dos episódios infecciosos pelo fortalecimento do sistema imunológico com a intervenção de microorganismos probióticos *Lactobacillus*.

Dados da literatura demonstraram que o consumo de leite fermentado por *Lactobacillus gasseri* (KADOOKA et al., 2010) provocou a redução da adiposidade abdominal e do peso corporal em adultos com sobrepeso e tendência à obesidade. O consumo de diferentes espécies de *Lactobacillus* também auxiliou na restauração da microbiota intestinal e perda de peso em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica (WOODARD et al., 2009).

Kefir

No Brasil, os produtos probióticos mais amplamente disseminados são os leites fermentados: “produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios”. Dentre estes

leites fermentados está o *kefir* “cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com seus grãos” (BRASIL, 2007).

Os grãos de *kefir* são uma estrutura complexa de associação simbiótica entre fungos (leveduras), bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos (IRIGOYEN et al., 2005; WESCHENFELDER et al., 2009). A composição microbiológica presente nessa estrutura não é integralmente conhecida, pois varia conforme uma série de fatores como região de origem, tempo de utilização, substrato utilizado e técnicas aplicadas na manipulação desses grãos (MAGALHÃES et al., 2011).

A caracterização microbiológica dos grãos *kefir*, definida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2007), é de que são compostos por micro-organismos *Lactobacillus kefiri*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Constituídos também por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguum*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*.

Magalhães et al. (2011), realizaram a caracterização microbiológica da bebida de *kefir* produzida com grãos brasileiros e substrato de leite integral pasteurizado e identificaram micro-organismos semelhantes aos da definição citada anteriormente, em ordem decrescente de concentração as bactérias *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Acetobacter lovaniensis*, *Lactobacillus kefiri* e *Lactococcus lactis* e as leveduras, também nessa ordem, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kazachstania aerobia* e *Lachancea meyersii*.

A dupla fermentação inerente ao processo de produção da bebida de *kefir* (fermentação láctica e alcoólica), é de suma importância na melhora da biodisponibilidade do produto, de maneira a torná-lo mais nutritivo. O produto obtido apresenta uma série de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam na manutenção e restabelecimento de funções imprescindíveis ao organismo (IRIGOYEN et al., 2005; SANTOS et al., 2012).

A eficácia terapêutica do consumo regular de *kefir* como alimento probiótico, fazendo parte de uma dieta usual, já está demonstrada na

modulação da microbiota intestinal e sistema imunológico, manutenção da integridade da mucosa intestinal, atividades antimicrobianas, antitumorais, antiinflamatórias, antialergênicas e hipocolesterolêmicas (SANTOS et al., 2012).

Hong et al. (2009) demonstraram a capacidade imunomodulatória do kefir *in vitro*, sugerindo que a linha de ação do probiótico está no seu impacto sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α . Vinderola et al. (2005) observaram a eficácia do *kefir* na modulação de respostas imunes *in vivo*, demonstrando uma melhora na produção de imunoglobulinas A e G (IgA e IgG), no intestino de ratos.

Enquanto seu efeito hipocolesterolêmico envolve a redução da absorção de colesterol no intestino, utilizando-se não somente da ligação e incorporação de colesterol nas células bacterianas, assim como da supressão da reabsorção de ácidos biliares capazes de hidrolisar essas gorduras. Liu et al. (2006) e Wang et al. (2009), comprovaram essa hipótese ao verificarem uma redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicerídeos, enquanto os níveis de HDL permaneceram estáveis. O segundo estudo, observou ainda que no fígado também houve diminuição de colesterol total e triglicerídeos, já nas fezes dos animais os índices aumentaram significativamente, sugerindo a eliminação desses lipídeos.

2 Artigo

Formatado segundo as normas da revista *Nature*

Effect of *kefir* consumption in chronic inflammatory diseases: obesity and associated metabolic disorders

Micaela Gonçalves Vivan, Thais Marten, Derlange Bilzário Diniz, Carlos Castilhos Barros, Márcia Rúbia Duarte Buchweitz

ABSTRACT

Obesity is among the fastest growing chronic diseases in the world and can be a precursor to important metabolic disorders such as type 2 diabetes, dyslipidemia and cardiovascular diseases. Microbiological interventions with probiotics have been more frequently held, and *kefir* has been demonstrating several evidences of therapeutic efficacy. The aim of this study was to evaluate the effect of *kefir* consumption on obesity and metabolic disorders associated with it. In this study *kefir* was able to reduce body mass (NDS 118.5±1.38; CDS 138.7±2.66; NDK 109.0±1.63; CDK 120.9±2.96, p<0.001), liver (NDS: 23.0±0.99; CDS: 26.8±0.49; NDK: 21.5±0.66; CDK: 25.5±0.54; p<0.001), heart (NDS: 1.43±0.06; CDS: 1.53±0.03; NDK: 1.36±0.03; CDK: 1.40±0.03; p=0.02) and adipose tissue (NDS: 16.7±1.79; CDS: 38.3±6.75; NDK: 14.5±1.71; CDK: 23.4±2.41; p=0.04) masses. In addition, it was observed an increase in muscle mass (NDS: 5.50±0.42; CDS: 5.42±0.31; NDK: 5.96±0.42; CDK: 7.44±0.52; p=0.02), and no relation between *kefir* intake and food intake variations. Further analyses must be conducted in order to verify the profound benefits of *kefir* consumption as part of a diet.

INTRODUCTION

The influence of lifestyle and eating habits over the risk of obesity manifestation has been increasingly evident. Associating sedentary behavior to a diet rich in fats, refined cereals, sugar, salt, red meat, embedded and ultra-processed food, compose the “westernized” lifestyle, predominant nowadays in industrialized and developing countries¹. According to the World Health Organization², 39% of adults in the world, with 18 years or older, are overweight, among them, 13% are obese. Obesity is currently one of the major contributors to increased mortality, since it is precursor to a number of other diseases, such as, insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease and cancer^{1,2,3}.

In this context, it was observed the existence of a mechanism able to explain and unify the physiopathogenic aspects related to obesity. The meta-inflammation consists in a strong combination between excessive nutrient consumption a deregulation of

cellular and molecular mediators of immunity and inflammation, causing a low-grade chronic inflammatory response to obesity, with adverse systemic effects⁴.

Intestinal microbiota may have important metabolic and immune functions. In obese individuals, the gut microbiota is capable of greater harvest capability of energy provided by diet, with direct impact on the development of the meta-inflammation^{5,6,7}. Obesity is associated with a reduced diversity of beneficial bacteria colonizing the human gut and a major disbiose, in which species belonging to the phylum Firmicutes emerge in greater quantity than the Bacteroidetes phylum^{8,9,10,11}.

However, since 1908, Metchnikoff¹² noted that some micro-organisms belonging to Firmicutes phylum have functional properties in the human host. Among the main micro-organisms with probiotic potential are the Lactobacillus, most commonly found in commercial foods, they have demonstrated direct relation to immune modulation processes and reduced inflammatory responses^{13,14}.

In order to promote the essential balance of intestinal microbiota, probiotics are being more frequently used as microbiological interventions¹⁵. In Brazil, the most widely disseminated probiotic products are the fermented milk, described by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply¹⁶ as “products resulting from the fermentation of pasteurized or sterilized milk by their own lactic yeasts and bacteria”. Kefir grains are a complex structure of symbiotic association between yeasts, lactic-acid and acetic-acid bacteria, enveloped by a polysaccharide matrix^{17,18}. When added to the milk, they promote fermentation. The kefir fermented milk has characteristics that support the maintaining and restoring essential functions on human body, and has demonstrated its therapeutic efficacy as a probiotic food^{18,19,20}.

Given the above, the aim of the study was to evaluate the therapeutic potential of kefir consumption in animals subjected to “westernized” diet as induced model of obesity and metabolic disorders associated to it.

RESULTS

Kefir reduced relative body mass

Mice from Normal Diet Kefir (NDK) and Cafeteria Diet Kefir (CDK) groups had lower relative body masses, respectively, from weeks 14 and 10 to the end of the experiment, when compared to their controls Normal Diet Saline (NDS) and Cafeteria Diet Saline (CDS) groups (NDS 117.1 ± 0.78; CDS 134.8 ± 0.88; NDK 109.6 ± 0.23;

CDK 122.9 ± 0.37 g, $p<0.001$; Figure 1). CDK (122.6 ± 1.33) group had higher body mass than NDS (110.57 ± 0.92) along obesity induction, although in the last few weeks of treatment differences between the groups were no longer observed ($p=0.098$; $p=0.202$; $p=0.484$). During all experimental protocol, CDS (125.9 ± 2.78) group presented higher body mass than NDS (110.3 ± 1.26) group of animals (Figure 1A). By the end of 16th week, differences in all final relative body masses were observed between groups (NDS 118.5 ± 1.38 ; CDS 138.7 ± 2.66 ; NDK 109.0 ± 1.63 ; CDK 120.9 ± 2.96 g , $p<0.001$; Figure 1B).

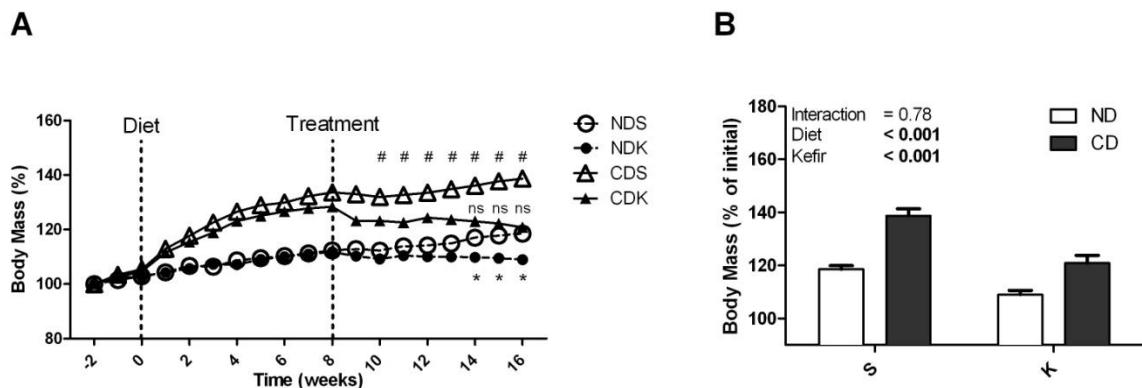


Figure 1: Body mass. A) Weekly registered relative body mass over the acclimatization period (-2 to 0 weeks), obesity induction (0-8 weeks) and treatment (8-16 weeks). Time -2 refers to initial body mass. Treatment reduced animal body masses when compared to controls. B) Means of final relative body masses. Data presented as means \pm SEM. # $p<0.05$ when comparing CDK and CDS groups; * $p<0.05$ when comparing NDK and NDS groups

Differences in food intake were found to be independent of *kefir* treatment

Food intake was different between groups since acclimatization period, NDS and CDS groups presented lower values than NDK and CDK groups during weeks -2 (NDS 351.0 ± 8.39 ; CDS 403.0 ± 16.11 ; NDK 425.8 ± 13.36 ; CDK 423.8 ± 7.48 g, $p<0.001$; Figure 2A) and -1 (NDS 426.5 ± 3.83 ; CDS 398.7 ± 6.20 ; NDK 459.8 ± 2.96 ; CDK 408.7 ± 10.72 g, $p<0.001$; Figure 2A). Cafeteria diet groups presented higher food intake during all experimental protocol, since week 0 (CDS 983.4 ± 55.69 ; CDK 915.8 ± 57.92) comparing to normal diet groups (NDS 460.3 ± 9.83 ; NDK 487.0 ± 6.07). All differences between the 4 groups were significative along weeks of experiment, except when comparing NDS and NDK groups, after the beginning of treatment (Figure 2A). These findings lead reason to believe that food intake amounts were independent from *kefir* treatment or stress caused by gavage procedures.

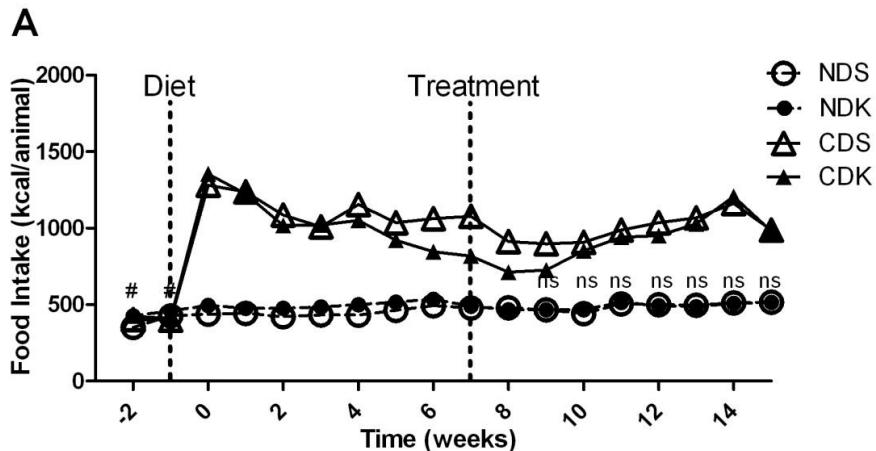


Figure 2: Food intake. A) Weekly registered food intake over the acclimatization period (-2 and -1 weeks), obesity induction (0-7 weeks) and treatment (8-15 weeks). Time -2 refers to the beginning of experimental protocol. Food intake was higher in cafeteria diet groups comparing to normal diet ones, and independent from *kefir* treatment. Data presented as means \pm SEM. # $p<0.05$.

Cafeteria diet increased basal glycemia, but has not affected peripheral insulin sensitivity

Animals exposed to cafeteria diet (CDS and CDK) presented higher glycemic levels in the GTT than normal diet ones (NDS and NDK), at times -30 (NDS 91.4 ± 4.40 ; CDS 109.0 ± 5.54 ; NDK 99.3 ± 2.07 ; CDK 103.5 ± 3.37) and 60 minutes (NDS 120.4 ± 6.04 ; CDS 180.6 ± 16.42 ; NDK 135.3 ± 5.73 ; CDK 170.4 ± 12.22). Area under the curve of cafeteria diet animals was also higher (22849.0 ± 228.3) than normal diet groups (18304.0 ± 519.8). However, in the ITT, insulin promoted gradual decrease in blood glucose in all animals, and *kefir* intake has not presented effects on cafeteria diet groups.

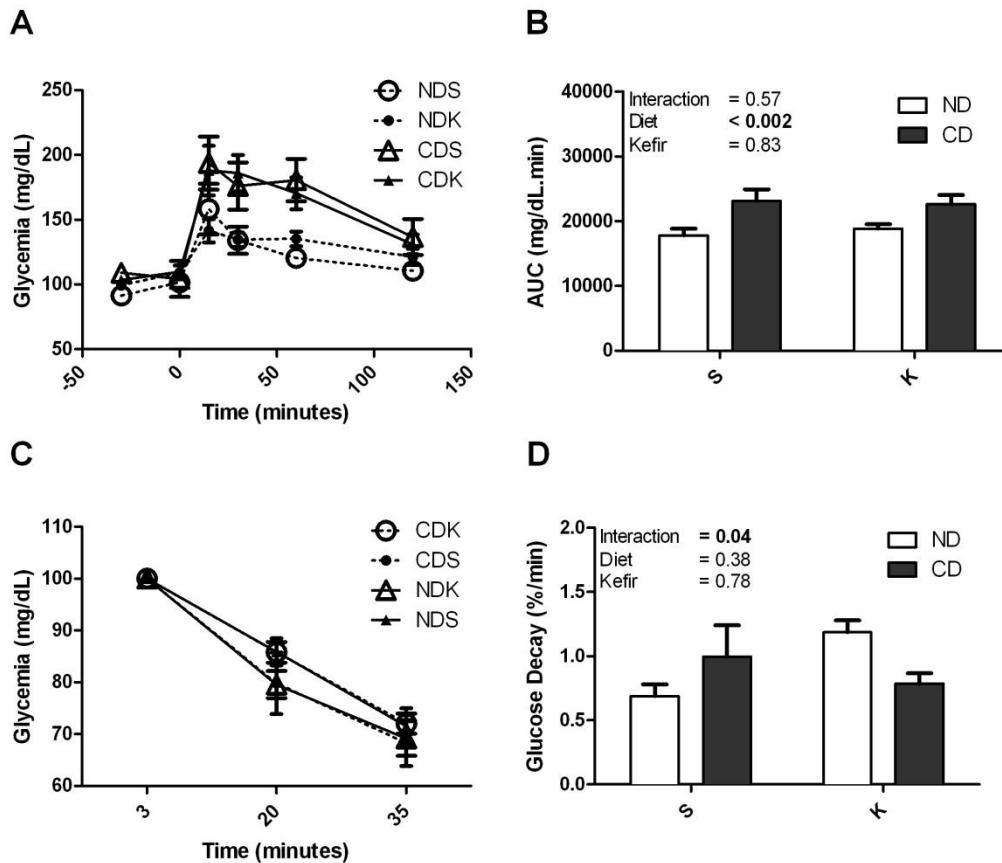


Figure 3: Glycemic parameters. A) Blood glucose at times -30, 0, 15, 30 and 60 minutes in GTT. B) Under the curve area of blood glucose in GTT. Cafeteria diet increased basal glycemia at -30 and 60 minutes, in addition to its effect of increasing area under the curve. C) Glycemia at times 3, 20 and 35 minutes, and its decrease under the effect of insulin administration in ITT. D) Glucose decay and no positive effects of *kefir* consumption. Data presented as means \pm SEM.

***Kefir* consumption reduced liver, heart and adipose tissue masses in addition to an increase in muscle mass**

In the same time as cafeteria diet groups presented higher relative liver masses (CDS 26.8 ± 0.49 ; CDK 25.5 ± 0.54) than normal diet groups (NDS 23.0 ± 0.99 ; NDK 21.5 ± 0.66), animals under *kefir* treatment conditions were observed to evidence lower liver masses (Figure 4A). The same effect has been verified in adipose tissue masses (Figure 4B), where NDK (14.5 ± 1.71) and CDK (23.4 ± 2.41) groups presented lower fat contents (NDS 16.7 ± 1.79 ; CDS 38.3 ± 6.75). In heart tissues (Figure 4C), there were no differences between normal and cafeteria diet, although *kefir* treatment demonstrated positive effects on animals under both diets (NDS 1.43 ± 0.06 ; NDK 1.36 ± 0.03 ; CDS 1.53 ± 0.03 ; CDK 1.40 ± 0.03). In addition to these findings, it was possible to observe a greater content of muscle mass (Figure 4D) in *kefir* treated animals (NDK: 5.96 ± 0.42 ; CDK: 7.44 ± 0.52) than controls (NDS: 5.50 ± 0.42 ; CDS: 5.42 ± 0.31), cafeteria diet has

not shown significative different effects over muscle composition when compared to normal diet.

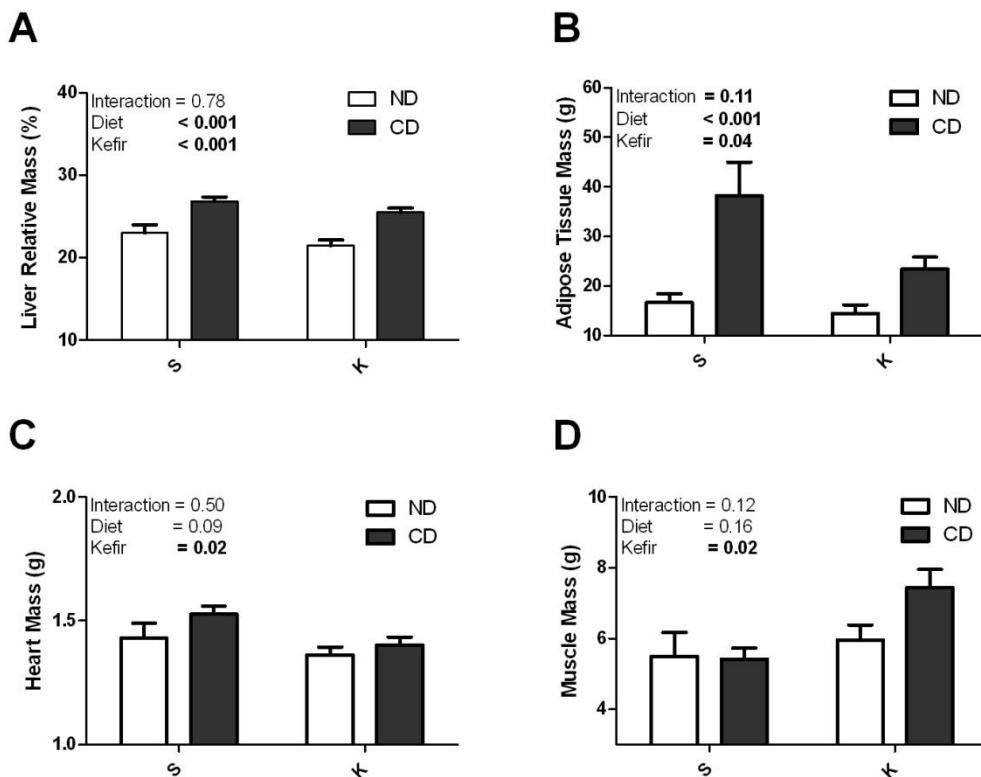


Figure 4. Tissue masses. Graphics show relative liver mass (A), adipose tissue (B), heart (C) and muscle masses (D) in each one of the groups. Treatment showed positive reduction in liver, heart and adipose tissue masses. An increase in muscle mass was also verified. Data presented as means \pm SEM.

DISCUSSION

In order to find new therapeutic alternatives to oppose the increasing prevalence of comorbidities associated with obesity, Kefir fermented milk has been more profoundly studied, due to its potential as a probiotic food, capable to assist on prevention and treatment of several conditions as obesity and other metabolic disorders associated to it¹⁵.

A study conducted with *kefir* supplementation on Metabolic Syndrome analyzed obesity pathological consequences on biochemical parameters, inflammatory cytokines and lipid peroxidation. Even though Rosa et al.²¹ have not found influences of *kefir* intake over animal's body mass, they have demonstrated decreasing indexes in abdominal and thoracic circumferences, as well as in products of lipid oxidation, and a reduction of more than 20% in fasting insulin tests.

Our finds come to reinforce that *kefir* fermented milk can be positively associated to body fat distribution, since abdominal adiposity accumulation is

extensively known as an important risk factor in the development of cardiovascular and metabolic diseases. *Kefir* has also been proved responsible for the promotion of decreasing oxidative stress in liver^{22,23,24,25}

As a probiotic food *kefir* can regulate gut microbiota, fact directly associated to immune-inflammatory system modulation, and consequently, the prevention of several diseases, acute and chronic, such as obesity and all metabolic disorders related to its physiopathogenic processes^{20,26}.

METHODS

Ethics. All experimental procedures were grounded in Brazilian guidelines for research involving animals, and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Universidad Federal de Pelotas (protocol no. 4159-2015).

Animals. Thirty two male adult *Wistar* mice were weighed and randomized in polypropylene cages (49cm x 34cm x 16cm), four mice/cage. The animals were maintained in a 12h light-dark cycle and 22°±2°C temperature-controlled environment, with free access to food and water. Two weeks after, they were divided in four groups with eight animals each: 1) NDS receiving standard rodent chow and water *ad libitum* plus saline solution gavage; 2) NDK receiving standard rodent chow and water *ad libitum* plus *kefir* fermented milk gavage; 3) CDS receiving cafeteria diet and water *ad libitum* plus saline solution gavage; 4) CDK receiving cafeteria diet and water *ad libitum* plus *kefir* fermented milk gavage. Animals body mass were registered weekly.

Experimental protocol. The experimental protocol was conducted for eighteen weeks. Initially, the thirty two animals received standard rodent chow and water *ad libitum* over two weeks for acclimatization period. During the follow eight weeks, sixteen animals remained under those conditions and the other sixteen animals were fed in addition with cafeteria diet. Through the last eight weeks, half (eight) animals of previous groups received saline solution, and the other half received *kefir* fermented milk. At the end of seventee^{nth} and eightee^{nth} weeks *in vivo* tests were performed. Two days after the last test, animals were euthanized.

Diets. Normal diet offered to animals was commercial rodent chow (Nuvilab CR-1 – Nuvital, Curitiba, Brazil®), with 55,0% carbohydrate, 22,0% protein, 4,5% lipids, and 18,5% of other compounds, resulting in 2,93kcal/g, according to the manufacturer's information. Cafeteria diet has been used in experimental studies as a protocol to induce obesity in animals, due to its similarity with “westernized” diet, characteristic of current

lifestyles. In this study, cafeteria diet chosen protocol was the presented by Macedo et al. (2012), composed with soda, condensed milk, sausage, chips, wafer and sandwiched biscuit. According to the authors, this diet offers 4,2kcal/g, in which 60,0% are carbohydrate, 20,0% protein, 15,0% lipids and 5,0% of other compounds. Both diet amounts were weighted before offered, and also their remaining, to allow consumption estimative.

Kefir. Kefir grains were obtained with Ceara State University labs. The *kefir* fermented milk was produced according to Santos et al. (2012), and offered to treatment group animals in dose corresponding to 3ml/animal/day, by gavage procedure. Control group animals received saline solution in same dosage, through same procedure.

In vivo tests. Glucose tolerance test was performed by the end of week seventeen. In order to initiate de test, 1 gram of glucose by kilogram of body mass was injected intraperitoneally, after an eight-hour fasting. Glycemia (mg/dL) was measured in blood samples collected from a small cut at the caudal extremity of mice and applied in reagent strips at time -30, 0, 15, 30, 60 and 120 minutes. Insulin tolerance test was performed by the end of week eighteen. For this test, 1IU of insulin by kilogram of body mass was injected intraperitoneally, after a six-hour fasting. Glycemia (mg/dL) was measured in blood samples collected from a small cut at the caudal extremity of mice and applied in reagent strips at time 0, 3, 20 and 35 minutes. The glucose measurements were read with Accu-Chek Performa glucometer and strips (Roche, Sao Paulo, Brazil®).

Euthanasia. Two days after last *in vivo* test was performed, animals were submitted to a twelve-hour fasting during night, and were euthanased with intravenous injection of Thiopental, dose 25 grams per kilogram of body mass, followed by cardiac puncture exsanguination.

Blood and tissue collection. Blood samples were collected and centrifugated at 4000 rpm for serum extractions, which were stored at -20 ° C for later analysis. Heart, liver, abdominal adipose tissues (epididymal and perirenal) and skeletal muscle (sural triceps) were manually dissected and weighted in precision scaled balance. Fragments were collected, preserved in formaldehyde 10% buffered solution, or rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for further analysis to extend understandings.

Statistical analysis. Results were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). All statistical analysis were conducted using the Prism 6.0 statistical package

(GraphPad Software, La Jolla, USA). Differences between groups were compared and analyzed by two-way ANOVA. Significance level was determined as 5% (p<0.05).

References

- ¹Mozaffarian, D.; Hao, T.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* **364**, 2392–2404 (2011).
- ²World Health Organization. Fact sheet – n° 311: obesity and overweight. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. (2015).
- ³Shoelson, S.E.; Herrero, L.; Naaz, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* **132**, 2169–2180 (2007).
- ⁴Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
- ⁵Ley, R.E. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 5-11 (2010).
- ⁶Sommer, F.; Backhed, F. The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **11**, 227-238 (2013).
- ⁷Blottiere, H.M.; De Vos, W.M.; Ehrlich, S.D.; Dore, J. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Curr Opin Microbiol* **16**, 232-239 (2013).
- ⁸Jumpertz, R.; Le, D.S.; Turnbaugh, P.J.; Trinidad, C.; Bogardus, C.; Gordon, J.I. Krakoff, J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **94**, 58-65 (2011).
- ⁹Angelakis, E.; Armougom, F.; Million, M.; Raoult, D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* **7**, 91-109 (2012).
- ¹⁰Sweeney, T.E.; Morton, J.M. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg* **148**, 563-569 (2013).
- ¹¹Verdam, F.J.; Fuentes, S.; De Jonge, C.; Zoetendal, E.G.; Erbil, R.; Greve, J.W. et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* **21**, 607-615 (2013).
- ¹²Metchnikoff, Elie. The prolongation of life - optimistic studies. *New York: Putman's Sons*, 161-183 (1908).
- ¹³Ng, S.C.; Hart, A.L.; Kamm, M.A.; Stagg, A.J.; Knight, S.C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 300–310 (2009).
- ¹⁴Enge, A.L.; Holt, G.E.; Lu, H. The pharmacokinetics of toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Rev Clin Pharmacol* **4**, 275-289 (2011).
- ¹⁵Vandenplas, Y.; Huys, G.; Daube, G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)* **91**, 6-21 (2015).

¹⁶Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolution n. 46. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>. (2007).

¹⁷Irigoyen, A.; Arana, I.; Castiella, M.; Torre, P. Microbiology, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry London* **90**, 613-620 (2005).

¹⁸Weschenfelder, S.; Pereira, G.M.; Carvalho, H.H.C.; Wiest, J.M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arq. Bras Med Vet Zootec* **63**, 473-480 (2011).

¹⁹Otle, S.; Cagindi, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* **2**, 54-59 (2003).

²⁰Santos, F. L.; Silva, E.; Barbosa, A.; Silva, J. Kefir: uma nova fonte alimentar funcional? *Diálogos & Ciência (Online)* **10**, 1-14 (2012).

²¹Rosa, D.D.; Grzeskowiak, L.M.; Ferreira, C.L.; Fonseca, A.C.; Reis, S.A.; Dias, M.M. et al. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome. *Food Funct* **10**, 3390-3401 (2016)

²²Després, J.P. Abdominal obesity: the most prevalent cause of the metabolic syndrome and related cardiometabolic risk. *European Heart Journal Supplements* **8**, B4-B12 (2006).

²³Ho J.N.; Choi, J.W.; Lim, W.C.; Kim, M.K.; Lee, I.Y.; Cho, H.Y. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *Journal of the science of food and agriculture* **93**, 485-490 (2013).

²⁴Liu, J.; Lin, Y.; Chen, M.; Chen, L.; Lin, C. Antioxidative activities of kefir. *Asian Australas J Anim Sci* **18**, 567-572.

²⁵Punaro, G.R.; Rodrigues, A.M.; Maciel, F.R.; Rogero, A.M.; Bogsan, C.S.B.; Oliveira, M.N. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide* **37**, 53-60 (2010).

²⁶Magalhães, K.T.; Dragone, G.; Melo, P.G.V.; Domingues, L.; Oliveira, J.M.; Teixeira, J.A. et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chem* **126**, 249-253 (2011).

Acknowledgements. We would like to thank the Federal University of Pelotas and Higher Education Personal Improvement Coordination for all support, including financial.

Author Contributions. All authors contributed equally to this work.

Author Information. Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to Micaela Gonçalves Vivan (micaela_gv@hotmail.com).

Affiliations.

Post-graduation Program in Food and Nutrition, Nutrition Department, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Micaela Gonçalves Vivan, Márcia Rúbia Duarte Buchweitz, Carlos Castilhos Barros

Post-graduation Program in Food and Biotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Thais Marten

Academic Master's Course in Food and Health, State University of Ceará

Derlange Bilzário Diniz

3. Referências

- ALIPOUR, A.; ELTE, J.W.; VAN ZAANEN, H.C.; RIETVELD, A.P.; CABEZAS, M.C. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. 3, p. 466–469, jun 2007.
- ANDERSSON, C.X.; GUSTAFSON, B.; HAMMARSTEDT, A.; HEDJAZIFAR, S.; SMITH, U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, n. 8, p. 595–603, nov/dez 2008.
- ANGELAKIS, E.; ARMOUGOM, F.; MILLION, M.; RAOULT, D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 91-109, jan 2012.
- ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J.P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 1, p. 2-11, fev 2008.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G.Y.; NAGY, A. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, nov 2004.
- BATISTA FILHO, M.; MIGLIOLI, T.C.; SANTOS, M.C. Anthropometric normality in adults: the geographical and socio-economic paradox of the nutritional transition in Brazil. **Rev Bras Saude Mater Infant**, v. 7, n. 4, out/dez 2007.
- BAYS, H.E.; GONZALES-CAMPOY, J.M.; BRAY, G.A.; KITABCHI, A.E.; BERGMAN, D.A.; SCHORR, A.B. et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. **Expert Rev Cardiovas Ther**, v. 6, n. 3, p. 343-368, mar 2008.
- BERG, A.H., SCHERER, P. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 96, n. 9, p. 939-949, mai 2005.
- BERTIN, E.; NGUYEN, P.; GUENOUNOU, M.; DURLACH, V.; POTRON, G.; LEUTENEGGER, M. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are essentially dependent on visceral fat amount in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab**, v. 26, n. 3, p. 178-182, mai 2000.
- BLACKBURN, P.; DESPRÉS, J.P.; LAMARCHE, B.; TREMBLAY, A.; BERGERON, J.; LEMIEUX, I. et al. Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 10, p. 1747–1754, out 2006.
- BRASIL, A.R.; NORTON, R.C.; ROSSETTI, M.B.; LEO, E.; MENDES, R.P. C-reactive protein as an indicator of low intensity inflammation in children and adolescents with and without obesity. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 5, p. 477-480, set/out 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Obesidade. **Cadernos de Atenção Básica** - n.^o 12. Brasília – DF, 2006. Disponível em: <https://www.nestle.com.br/nestlenutrisaude/Conteudo/diretriz/Atencao_obesidade.pdf> Acesso em: 20 de abril de 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância alimentar e nutricional - SISVAN**: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde. Brasília - DF, 2004. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/orientacoes_basicas_sisvan.pdf> Acesso em: 17 de abril de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução nº 46**, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 17 de abril de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2013**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília – DF, 2014. Disponível em: <<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/morbidade/Vigitel-2013.pdf>> Acesso em: 20 de abril de 2015.

CANCELLA, R.; HENEGAR, C.; VIGUERIE, N.; TALEB, S.; POITOU, C.; ROUAULT, C. Reduction of Macrophage Infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-2286, ago 2005.

DANDONA, P.; WEINSTOCK, R.; THUSU, K.; ABDEL-RAHMAN, E.; ALJADA, A.; WADDEN, T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 8, p. 2907-2910, ago 1998.

DESPRESS, J.P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, dez 2006.

ENGE, A.L.; HOLT, G.E.; LU, H. The pharmacokinetics of toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 4, n. 2, p. 275-289, 2011.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES. **Relatório 2013**. Disponível em: <<http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/IDF-AR2013-final-rv.pdf>>. Acesso em 17 de abril de 2015.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, P.; NAJIB, S.; SANTOS-ALVAREZ, J.; MARTÍN-ROMERO, C.; PÉREZ-PÉREZ, A.; GONZALES-YANES, C. et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. 1, p. 1-8, jan 2010.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-139, mar 2010.

GLEW, Robert.; CRABB, David. Inter-relações metabólicas. In: DEVLIN, Thomas. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6^a ed. São Paulo: Editora Blücher, 2007. p. 830-869.

GOOSSENS, G.H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p.206–218, mai 2008.

GUILLEMARD, E.; TANGUY, J.; FLAVIGNY, A.; DE LA MOTTE, S.; SCHEZENMEIR, J. Effects of consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on common respiratory and gastrointestinal infections in shift workers in a randomized controlled trial. **J Am Coll Nutr**, v. 29, n. 5, p. 455-468. out 2010a.

GUILLEMARD, E.; TONDU, F.; LACOIN, F.; SCHREZENMEIR, J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. **Br J Nutr**, v. 103, n. 1, p. 58-68, jan 2010b.

GUIMARÃES, D.E.D.; SARDINHA, F.L.C.; MIZZURINI, D.M.; Carmo, M.G.T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev Nutr**, v. 20, n. 5, p. 549-559, set/out 2007.

HILL, J.O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocr Rev**, v. 27, n. 7, p. 750-761, dez 2006.

HONG, W.S.; CHEN, H.C.; CHEN, Y.P.; CHEN, M.J. Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. **Int Dairy J**, v. 19, n. 4, p. 244-251, abr 2009.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009** - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf>. Acesso em: 20 de abril de 2015.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P. Microbiology, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry London**, v. 90, n. 4, p. 613-620, mai 2005.

JI, Y.S.; KIM, H.N.; PARK, H.J.; LEE, J.E.; YEO, S.Y.; YANG, J.S. et al. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. **Benef Microbes**, v. 3, n. 1, p. 13-22, mar 2012.

JUMPERTZ, R.; LE, D.S.; TURNBAUGH, P.J.; TRINIDAD, C.; BOGARDUS, C.; GORDON, J.I. KRAKOFF, J. Energy-balance studies reveal associations

between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 1, p. 58-65, jul 2011.

KADOOKA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI, K.; OGAWA, A.; IKUYAMA, K.; AKAI, Y.; et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 6, p. 636-43, jun 2010.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K.; KITAZAWA, R. et al: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, jun 2006.

KNIGHTS, D.; LASSEN, K.G.; XAVIER, R.J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**, v. 62, n. 10, p. 1505-1510, out 2013

KOSTELI, A.; SUGARU, E.; HAEMMERLE, G.; MARTIN, J.F.; LEI, J.; ZECHNER, R. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 120, n. 10, p. 3466–3479, out 2010.

LAHOZA, C.; MOSTAZAA, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. **Rev Esp Cardiol**, v. 60, n. 2, p. 184-95, fev 2007.

LAU, D.C.W.; DHILLON, B.; YAN, H.; SZMITKO, P.E.; VERMA, S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. 2031-2041, mai 2005

LEBEER, S.; JOS VANDERLEYDEN, S.; DE KEERSMAECKER, C.J. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 72, n. 4, p. 728-764, dez 2008.

LEE, H.Y.; PARK, J.H.; SEOK, S.H.; BAEK, M.W.; KIM, D.J. LEE, K.E. 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, n. 7, p. 736-44, jul 2006.

LEITE, L. D.; ROCHA, É. D. M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul/dez 2009.

LEY, R.E. Obesity and the human microbiome. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 1, p. 5-11, jan 2010.

LEY, R.E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, ago 2005.

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837-848, fev 2006.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, dez 2006.

LIU, J.R.; WANG, S.Y.; CHEN, M.J.; CHEN, H.L.; YUEH, P.Y.; LIN, C.W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilkkefir in cholesterol-fed hamsters. **Br J Nutr**, v. 95, n. 5, p. 939-946, mai 2006.

MACEDO, I. C.; MEDEIROS, L. F.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C. M.; ROZISKY, J. R.; SCARABELOT, V. L. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 189-196, nov 2012.

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; CAMPOS, C.R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693-702, abr 2011.

MERENSTEIN, D.; MURPHY, M.; FOKAR, A.; HERNANDEZ, R.K.; PARK, H.; NSOULI, H. et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study. A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 7, p. 669-677, jul 2010.

METCHNIKOFF, Elie. **The prolongation of life - optimistic studies**. New York: Putman's Sons, 1908. p. 161-183.

MOZAFFARIAN, D.; HAO, T.; RIMM, E.B.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. **N Engl J Med**, v.364, n.25, p. 2392–2404, jun 2011.

NAKAMURA, Y.; UESHIMA, H.; OKUDA, N.; HIGASHIYAMA, A.; KITA, Y.; KADOWAKI, T. et al. Relation of dietary and other lifestyle traits to difference in serum adiponectin concentration of japanese in Japan and Hawaii: the INTERLIPID study. **Am J Clin Nutr**, v.88, n. 2, p. 424–430, ago 2008.

NEELS, J.G.; OLEFSKY, J.M. Inflamed fat: what starts the fire? **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 33-35, jan 2006.

NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J.; KNIGHT, S.C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 2, p. 300–310, 2009.

OLIVEIRA, J. S; BRESSAN, J. Tecido adiposo como regulador da inflamação e da obesidade. **EFDeportes** (Revista Online), v. 15, n. 150, nov 2010.

PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 162, n. 2, p. 101–114, jul 2005.

PISTELLI, G.C.; COSTA, C.E.M. Bactérias intestinais e obesidade. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 115-119, jan/abr 2010.

PRADO, Wagner Luiz. **Efeitos do tratamento multidisciplinar sobre fatores orexígenos, anorexígenos, pró e antiinflamatórios em adolescentes obesos**. 2007. 132f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.

RODRIGUES, A. Microbiota intestinal e sua possível relação com a obesidade. **Revista Abeso**, v. 11, n. 53, p. 5-7, out 2011.

SANTOS, F. L.; SILVA, E.; BARBOSA, A.; SILVA, J. **Kefir: uma nova fonte alimentar funcional? Diálogos & Ciência (Online)**, v. 10, n. 29, p. 1-14, mar 2012.

SASAKI, J.E.; KRAUSE, M.P.; GAMA, M.P.R.; HALLAGE, T.; BUZZACHERA, C.F.; SANTOS, M.G. et al. Influencia da adiposidade global e da adiposidade abdominal nos níveis de proteína C-reativa em mulheres idosas. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 4, p. 231-236, out 2007.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v.132, n.6 , p. 2169–2180, mai 2007.

SILVA, S.T; SANTOS, C.A; BRESSAN, J. Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 4, p. 1039-1048, jul/ago 2013.

SILVEIRA, M.R.; FROLLINI, A.B.; VERLENGIA, R.; CAVAGLIERI, C.R. Correlation between obesity, adipokines and the immune system. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 4, p. 466-472, set 2009.

SMITH, T.J.; RIGASSIO-RADLER, D.; DENMARK, R.; HALEY, T.; TOUGER-DECKER, R. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* LGG and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 on health-related quality of life in college students affected by upper respiratory infections. **Br J Nutr**, v. 109, n. 11, p. 1999-2007, jun 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 101, n. 4, s. 1, out 2013.

SWEENEY, T.E.; MORTON, J.M. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. **JAMA Surg**, v. 148, n. 6, p. 563-569, jun 2013.

TAKEMURA, N.; OKUBO, T.; SONOYAMA, K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. **Exp Biol Med**, v. 235, n. 7, p. 849-856, jul 2010.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 772-783, out 2006.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R.; KASER, A. Obesity and the microbiota. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1476–1483, mai 2009.

TRAYHURN, P.; BING, C.; WOOD, I.S. Adipose tissue and adipokines - energy regulation from the human perspective. **J Nutr**, v. 136, n. 7, p. 1935–1939, jul 2006.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **J Pediatr (Rio J)**, v. 91, n. 1, p. 6-21, jan/fev 2015.

VERDAM, F.J.; FUENTES, S.; DE JONGE, C.; ZOETENDAL, E.G.; ERBIL, R.; GREVE, J.W. et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. 607-615, dez 2013.

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGON, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J Dairy Res**, v. 72, n. 2, p. 195-202, mai 2005.

WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; ZHANG, B.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, n. 2, p. 341- 347, ago 2009.

WESCHENFELDER, Simone. **Caracterização de kefir tradicional quanto á composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli***. 2009. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WOOD, I.S.; DE HEREDIA, F.P.; WANG, B.; TRAYHURN, P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proc Nutr Soc**, v. 68, n. 4, p. 370-377, nov 2009.

WOODARD, G.A.; ENCARNACION, B.; DOWNEY, J.R.; PERAZA, J.; CHONG, K.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T. et al. Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. **J Gastrointest Surg**, v. 13, n. 7, p. 1198-1204. Jul 2009.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. Global guidelines – probiotics and prebiotics. Disponível em:

<http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_pt_2012.pdf>. Acesso em: 17 de abril de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet** – nº 311: obesity and overweight. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 17 de abril de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Consultation on Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO Technical Report Series**. v. 284, p. 256, Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Physical Status - the use and interpretation of anthropometry phisical status. **WHO Technical Report Series**, v. 854, Geneva, 1995.

Anexos

Anexo 1 - Documento de aprovação do projeto na Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas

	
<p>Pelotas, 15 de setembro de 2015</p>	
<p>De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix <i>Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)</i></p>	
<p>Para: Profa. Dra. Márcia Rubia Duarte Buchweitz <i>Faculdade de Nutrição</i></p>	
<p>Senhora Professora:</p>	
<p>A CEEA analisou o projeto intitulado: “Efeito do consumo de kefir sobre doenças crônicas inflamatórias: obesidade e desordens metabólicas associadas”, processo nº23110.004159/2015-46 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer FAVORÁVEL a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).</p>	
<p>Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.</p>	
<p>Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4159-2015).</p>	
<p>Vigência do Projeto: 16/09/2015 a 30/12/2015</p>	
<p>Espécie/Linhagem: <i>Rattus norvegicus</i>/Wistar</p>	
<p>Nº de animais: 32</p>	
<p>Idade: 100 a 120 dias</p>	
<p>Sexo: Machos</p>	
<p>Origem: Biotério Central/Ufpel</p>	
	
<p>M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix <i>Presidente da CEEA</i></p>	
<p>Ciente em: <u>25 / 09 /2015</u></p>	
<p>Assinatura do Professor Responsável: <u>Márcia Rubia Duarte Buchweitz</u></p>	