



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

•

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Lactobacillus reuteri*
V3401 EN INDIVIDUOS ADULTOS OBESOS CON
SÍNDROME METABÓLICO SOBRE BIOMARCADORES
DE INFLAMACIÓN, RIESGO CARDIOVASCULAR Y
COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

**PRESENTADA POR:
CARMEN TENORIO JIMÉNEZ**

**DIRIGIDA POR:
Prof. Dra. MARÍA JOSÉ MARTÍNEZ RAMÍREZ
Prof. Dr. ÁNGEL GIL HERNÁNDEZ
Prof. Dra. CAROLINA GÓMEZ LLORENTE**

JAÉN, Febrero 2020



Universidad de Jaén

Programa de Doctorado de Seguridad de los Alimentos

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Lactobacillus reuteri* V3401 EN
INDIVIDUOS ADULTOS OBESOS CON SÍNDROME METABÓLICO
SOBRE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN, RIESGO
CARDIOVASCULAR Y COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL**

TESIS DOCTORAL

**Carmen Tenorio Jiménez
Jaén 2020**



Universidad de Jaén

La doctoranda Carmen Tenorio Jiménez y los directores de la tesis María José Martínez Ramírez, Ángel Gil Hernández y Carolina Gómez Llorente garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo es original y ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Jaén, a 12 de febrero de 2020

Director/es de la Tesis

Doctoranda

Fdo.:

Fdo.:

María José Martínez Ramírez

Carmen Tenorio Jiménez

Fdo.:

Ángel Gil Hernández

Fdo. :

Carolina Gómez Llorente

Este estudio se ha financiado a través de un contrato de investigación entre la Fundación General Universidad de Granada y la Empresa Biosearch Life S.A.: Proyecto nº 3600-00, “Guía para la sustanciación de declaraciones de salud en alimentos: funciones inmune, cognitiva y síndrome metabólico”.



AGRADECIMIENTOS

La realización de una Tesis Doctoral es siempre el fruto del trabajo y la ilusión de muchas personas, que forman parte de la vida del doctorando, apoyándolo en su tarea. Entre todos ellos, me gustaría agradecer de forma especial a los que han sido mis pilares fundamentales:

A mis directores de tesis sin los cuales no hubiera sido posible,

A María José Martínez por ser el motor y verdadera artífice del proyecto clínico, por su compañerismo, tutela y amistad.

A Ángel Gil por permitirme iniciarme en el mundo de la investigación en Nutrición, por su excelente supervisión y por transmitirme su pasión que ha sido un impulso en mi actividad clínica.

A Carolina Gómez por su rigor, implicación, dedicación, apoyo constante y, fundamentalmente, por todo el tiempo compartido, en el que tanto he aprendido y disfrutado.

A mis todos mis compañeros del Complejo Hospitalario de Jaén, sin los que no hubiera salido adelante este proyecto, especialmente a la Dra. Carmen Arraiza que tan generosamente realizó la evaluación clínica de los participantes a lo largo del estudio.

A todos los participantes en el estudio clínico PROSIR sin cuya adherencia al protocolo, muchas veces tedioso, y la entrega de sus muestras para fines de investigación, no se hubiera podido completar este trabajo.

A mi familia,

A mis padres que me transmitieron el valor del trabajo bien hecho y la fuerza de la voluntad y la constancia.

A mi hermano que siempre ha estado a mi lado, especialmente durante la parte más difícil en la realización de esta Tesis.

A mi abuela Virginia y a mi tío Lorenzo que siempre creyeron en mí y a los que sigo echando de menos.

A César por su cariño y paciencia.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Anexo I:

Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Gil Á, Gómez-Llorente C. Effects of Probiotics on Metabolic Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients* 2020 Jan 1; 12(1). pii: E124.

Anexo II:

Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Tercero-Lozano M, Arraiza-Irigoyen C, Del Castillo-Codes I, Olza J, Plaza-Díaz J, Fontana L, Migueles JH, Olivares M, Gil Á, Gomez-Llorente C. Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation, cardiovascular risk and liver steatosis in obese adults with metabolic syndrome: a randomized clinical trial (PROSIR). *BMC Complement Altern Med*. 2018 Nov 20;18(1):306.

Anexo III:

Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Del Castillo-Codes I, Arraiza-Irigoyen C, Tercero-Lozano M, Camacho J, Chueca N, García F, Olza J, Plaza-Díaz J, Fontana L, Olivares M, Gil Á, Gómez-Llorente C. *Lactobacillus reuteri* V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study. *Nutrients*. 2019 Jul 31;11(8). pii: E1761.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

ADCHJ: Aparato Digestivo del Complejo Hospitalario de Jaén

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

ARA: Antagonistas del receptor de angiotensina

ASV: *Amplicon sequencing variant* (Variante de secuencia exacta)

ATPIII: *Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program*

C

CC: circunferencia de cintura

CHJ: Complejo Hospitalario de Jaén

D

DE: Desviación estándar

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E

ECA: Ensayos clínicos aleatorizados y controlados por placebo

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDTA: Ácido etilenodiaminatetraacético

ENCHJ: Endocrinología y Nutrición del Complejo Hospitalario de Jaén

ENT: Enfermedades no transmisibles

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo enzimático ligado a un inmunoabsorbente)

F

FAO/WHO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDR: *False discovery rate* (Proporción de descubrimientos falsos)

FXR: receptor X farnesoide

G

GGT: gamma glutamiltransferasa

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1

GOT: Aspartato aminotransferasa

GPT: Alanina aminotransferasa

H

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HDLc: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos

HOMA-IR: Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina

HTA: Hipertensión arterial

I

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IECAS: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IL: Interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

IRS: Receptor de insulina

L

LDLc: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

LPB: Proteína de unión al lipopolisacárido

LPL: Lipoproteín-lipasa

LPS Lipopolisacárido

M

MHUSC: Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio.

MPO: Mieloperoxidasa

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

N

NAFLD: Hígado graso no alcohólico

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

OUTs: Unidades operacionales taxonómicas

P

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PCR: Proteína C reactiva

Q

QUIIME 2: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*

R

RBP-4: Proteína de unión de retinol-4

RNA: Ácido ribonucleico

S

SRI: Síndrome de resistencia a la insulina

SM: Síndrome metabólico

sVCAM-1: Molécula de adhesión vascular soluble-1

sICAM: Molécula de adhesión intercelular soluble-1

T

TG: Triglicéridos

TGI: Tracto gastrointestinal

TGR5: Receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G

TMAO: N-óxido de trimetilamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

U

UGR: Universidad de Granada

UFC: Unidades formadoras de colonias

V

VSG: Velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE

	Páginas
1. Resumen.....	1
2. Introducción y justificación	3
2.1. El síndrome metabólico.....	5
2.1.1. Obesidad y síndrome metabólico	5
2.1.2. Metabolismo glucídico y síndrome metabólico	6
2.1.3. Dislipemia, hipertensión arterial y síndrome metabólico.....	7
2.2. Microbiota gastrointestinal.....	8
2.3. Relación entre el síndrome metabólico y la microbiota intestinal	9
2.3.1. Lipopolisacárido bacteriano	10
2.3.2. Ácidos grasos de cadena corta	11
2.3.3. Ácidos biliares y N-óxido de trimetilamina	12
2.4. Estrategias de tratamiento del síndrome metabólico	13
3. Hipótesis y objetivos	17
3.1. Hipótesis.....	17
3.2. Objetivos	17
3.2.1. Objetivo general	17
3.2.2. Objetivos específicos	17
4. Metodología	19
4.1. Diseño experimental	19
4.2. Cálculo del tamaño muestral	21
4.3. Selección de participantes	22
4.4. Entrevista clínica, datos antropométricos y clínicos.....	23
4.5. Determinación de biomarcadores de inflamación y de esteatosis hepática...	23
4.6. Determinación de la microbiota intestinal	24
4.7. Análisis estadístico	24
5. Resultados.....	26
5.1. Parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos.....	26
5.2. Biomarcadores inflamatorios.....	27
5.3. Composición de la microbiota intestinal.....	29

6. Discusión	36
7. Conclusiones	38
7.1. Conclusión general y perspectivas futuras	38
8. Bibliografía	40
9. Anexos	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Páginas
FIGURA 1. Distribución de la población bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal .	8
FIGURA 2. Esquema del diseño experimental	21
FIGURA 3. Curvas de rarefacción	25
FIGURA 4. Evolución de los marcadores inflamatorios en el estudio.....	29
FIGURA 5. Composición taxonómica de las comunidades bacteriana al inicio del estudio.....	30
FIGURA 6. Diversidad alfa	31
FIGURA 7. Diversidad beta	32
FIGURA 8. Tendencia de la proporción relativa del filo <i>Verrucomicrobia</i> y el género <i>Akkermansia</i>	33
FIGURA 9. Abundancia relativa de los valores delta del filo <i>Verrucomicrobia</i>	34
TABLA 1. Evolución de los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos	27
TABLA 2. Evolución de los marcadores inflamatorios a lo largo del estudio.....	28

1. RESUMEN

Las enfermedades metabólicas han alcanzado proporciones epidémicas, sobre todo en los países desarrollados, constituyendo un grave problema de salud pública. Dentro de ellas destaca por su prevalencia e importancia como entidad clínica el síndrome metabólico (SM). El SM se caracteriza por la presencia de obesidad, alteración del metabolismo hidrocarbonado, hipertrigliceridemia, disminución de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) y otras alteraciones asociadas a aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). La alteración de la microbiota intestinal juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina asociada a obesidad y la modificación de la misma a través del uso de diferentes cepas de probióticos podría constituir una alternativa terapéutica en estos pacientes. En esta tesis, se evalúa el efecto de la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) V3401 sobre parámetros antropométricos, esteatosis hepática, marcadores inflamatorios y microbiota intestinal en pacientes con SM. Para ello, se ha realizado un estudio de intervención nutricional aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego tipo cruzado de dos vías. Se han incluido 53 sujetos adultos diagnosticados de SM en los cuales se ha llevado a cabo la intervención que consiste en la administración de una cápsula por vía oral durante 12 semanas (A = probiótico o B = placebo), tras las cuales se ha realizado un lavado de 6 semanas, y la iniciación de un segundo periodo de intervención de 12 semanas (A = placebo o B = probiótico) con la misma pauta. A todos los sujetos se les recomendó una dieta hipocalórica y actividad física regular. En el trabajo realizado no se han encontrado diferencias entre los grupos en parámetros antropométricos ni en esteatosis hepática, sin embargo, en los sujetos que estaban tomando la cepa probiótica, se ha observado una disminución de los parámetros inflamatorios interleuquina (IL) 6 y de la molécula de adhesión vascular soluble-1 (sVCAM-1) y un aumento de la *Akkermansia muciniphila*, cuya abundancia está disminuida en enfermedades metabólicas y cuya presencia ha sido considerada beneficiosa para la salud del huésped. La disminución de los parámetros inflamatorios hallada en nuestro estudio está en línea con hallazgos previos en estudios clínicos aleatorizados y controlados. Según los datos disponibles hasta el momento, los efectos de los probióticos sobre el huésped parecen ser cepa y dosis dependiente. Se necesitan más estudios de intervención aleatorizados y controlados en humanos para confirmar estos hallazgos.

Palabras clave: Obesidad, Síndrome Metabólico, Microbiota, Probióticos.

2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades metabólicas constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y, fundamentalmente, en países desarrollados. Dentro de este grupo de enfermedades, destaca por su prevalencia e implicaciones terapéuticas, el síndrome metabólico (SM).

El SM fue reconocido hace más de 80 años en la literatura médica y ha recibido diversas denominaciones a través del tiempo. No se trata de una única enfermedad sino de una asociación de alteraciones clínicas y metabólicas que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales (Calixto García et al. 2002). La mayoría de las definiciones propuestas incluyen la obesidad, la alteración del metabolismo glucídico y lipídico, y la hipertensión arterial (HTA), pero sus características principales son la presencia de obesidad y resistencia a la insulina, dando lugar a un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). La manifestación hepática del SM es la esteatosis y la manifestación cardiovascular es la aterosclerosis (de Groot et al. 2017). La inflamación subaguda sistémica es otro factor importante relacionado con el SM y con las ECV en general.

En los últimos años se ha establecido la importancia de la microbiota intestinal en el SM. La microbiota está constituida por el conjunto de microorganismos que colonizan establemente la superficie epidérmica y la de las mucosas, tales como las del aparato digestivo, aparato reproductor, tracto respiratorio y tracto urinario. Como microbiota se denomina a la composición taxonómica, mientras que sus genes son conocidos como microbioma. La microbiota juega un papel esencial en nuestra vida y su relación con nosotros es, generalmente, mutualista (beneficiosa para los dos socios de la simbiosis) (Suárez et al. 2015). Los microorganismos que la componen son muy abundantes; según los últimos estudios la proporción en nuestro organismo entre microbios y células humanas sería de 1,3:1 (Sender et al. 2016). La mayor abundancia de bacterias se localiza en el tracto gastrointestinal (TGI). La gran mayoría de los 10-100 billones de microbios que existen en el TGI humano viven en el colon. Más del 90% de todos los tipos filogenéticos bacterianos pertenecen a sólo a dos filos, en concreto, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Turnbaugh et al. 2007). Una alteración de la composición de la microbiota gastrointestinal puede contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (Backhed et al. 2004, 2007 y Turnbaugh et al. 2006). En este sentido, se ha descrito un cociente disminuido de *Bacteroidetes/Firmicutes* en individuos obesos comparado con los individuos delgados (Turnbaugh

et al. 2009). Asimismo, una microbiota gastrointestinal aberrante puede promover la inflamación sistémica subaguda, la resistencia a la insulina y el aumento de riesgo de ECV por mecanismos que incluyen la exposición a los productos bacterianos.

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa "para la vida" y actualmente se usa para nombrar bacterias que ejercen efectos beneficiosos en la salud para humanos y animales (FAO/WHO 2001). La definición más aceptada de probióticos es la de "microorganismos vivos, que cuando se consumen en cantidades adecuadas, confieren un efecto de la salud en el huésped" (Guarner et al. 1998). Las cepas más frecuentemente utilizadas como probióticos pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Bermúdez-Brito et al. 2012).

El tratamiento actual del SM se basa en cambios en el estilo de vida a través de medidas higiénico-dietéticas (dieta y ejercicio) combinadas con la terapia farmacológica, si es necesaria, para tratar los componentes del SM por separado y no como una sola entidad. El futuro en el abordaje del SM es que las terapias vayan orientadas a alterar el proceso inflamatorio. Es por ello, que el uso de los probióticos, como moduladores de la microbiota gastrointestinal y del sistema inmunológico (Bermúdez-Brito et al. 2012), podría proporcionar beneficios clínicos en el tratamiento de los componentes del SM, abriendo la posibilidad de un nuevo enfoque en el tratamiento de estos pacientes, no con fármacos sino con alimentos funcionales (Miglioranza et al. 2015). Sin embargo, los estudios de intervención para determinar el efecto de los probióticos sobre los componentes del SM son limitados y a menudo contradictorios, principalmente debido a diferencias en el diseño del protocolo de estudio, en la forma de administración y en la selección de la cepa probiótica, ya que los efectos observados son dependientes de la cepa administrada (Miglioranza et al. 2015).

La tesis que aquí se presenta se compone de 3 publicaciones : una revisión de la literatura científica sobre los efectos de la intervención con probióticos en el SM, incluyendo los estudios clínicos aleatorizados y controlados con placebo publicados hasta el 4 de julio de 2019 (Anexo 1), el protocolo del estudio clínico realizado con *L. reuteri* V3401 en adultos con SM (Anexo 2) y los resultados del estudio de intervención aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego que se ha realizado en el Complejo Hospitalario de Jaén (CHJ) con la colaboración de la Universidad de Granada (UGR) (Anexo 3).

2.1. EL SÍNDROME METABÓLICO

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), de los 56,4 millones de muertes mundiales que se produjeron en 2016, 39,5 millones (el 70%) se debieron a enfermedades no transmisibles (ENT). La carga de estas enfermedades está aumentando desproporcionadamente entre los países y las poblaciones de menores ingresos. En 2016, las enfermedades cardiovasculares causaron 15,2 millones muertes y la diabetes causó 1,6 millones muertes, constituyendo un desafío global de salud pública en expansión constante. Tres de las principales ENT (ECV, cáncer y diabetes) están más presentes en pacientes con SM (https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/). Además, el SM se ha reconocido como un estado protrombótico asociado a niveles elevados de proteína C reactiva (PCR), interleuquina (IL)-6, y del Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1 (Festa 2002 et al., Pradhan et al. 2001), es decir, un estado proinflamatorio sistémico. En este contexto, el SM, también etiquetado como “síndrome de resistencia a la insulina” (SRI) o “síndrome X”, es cada vez más reconocido como un importante factor de riesgo cardiovascular.

La OMS creó la primera definición internacionalmente reconocida del SM en 1998, en la que se describía este síndrome por la presencia de resistencia a la insulina [alteración de la glucosa en ayunas, deterioro de la tolerancia a la glucosa o Diabetes *Mellitus* tipo 2(DM2)] además de dos de los siguientes factores de riesgo: obesidad [proporción cintura-cadera o Índice de masa corporal (IMC)], hiperlipidemia [(hipertrigliceridemia, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDLc) bajo], y HTA o microalbuminuria (Rochlani et al. 2017). Desde esta primera definición, se han propuesto otras muy similares desde las sociedades *European Group for the Study of Insulin Resistance* en 1999, *I Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program* (ATPIII) en 2001, *International Diabetes Federation* (IDF) 2005 y *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute* en 2005. Todas incluyen los componentes individuales de obesidad, alteración del metabolismo glucídico y lipídico e hipertensión.

2.1.1. Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad se caracteriza por un aumento del tejido adiposo blanco y, según la OMS, se define en sujetos caucásicos adultos como un IMC ≥ 30 , mientras que tener un IMC ≥ 40 se relaciona con la presencia de obesidad mórbida (Heymsfield et al. 2017). Además, la obesidad está

hoy en día reconocida como una enfermedad que cursa con una inflamación sistémica de bajo-grado. Asimismo, existen numerosos estudios que relacionan una alteración de la composición de la microbiota intestinal en individuos obesos con respecto a individuos normopeso.

La obesidad ha aumentado rápidamente en las últimas décadas y está causada por una combinación de factores ambientales, humorales y genéticos. La mortalidad, la morbilidad y las complicaciones aumentan con el grado de obesidad. Los factores medioambientales implicados en esta epidemia incluyen actividad física disminuida y sedentarismo; mayor consumo de alimentos, en particular aquellos con alta densidad de energía; y el uso de medicamentos con aumento de peso como efecto secundario. Sin embargo, a pesar de estos factores ambientales, no todas las personas se vuelven obesas, lo que sugiere diferencias genéticas que predisponen a ciertos individuos a desarrollar obesidad (Upadhyay et al. 2018).

Las tasas de obesidad progresivamente crecientes han llevado a una epidemia global de enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) por acúmulo de grasa en los hepatocitos, la manifestación hepática del SM. Actualmente, el NAFLD es la causa más frecuente de enfermedad hepática a nivel mundial y se asocia a aumento de la mortalidad (Pimentel et al. 2018). Se describió por primera vez en 1970 con el término esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En la actualidad el término NAFLD engloba la esteatosis simple y la NASH.

2.1.2. Metabolismo glucídico y síndrome metabólico

La obesidad es un factor para el desarrollo de resistencia a la insulina e hiperinsulinismo, que conduce progresivamente a un agotamiento de la célula β . De ahí, que el desarrollo de DM2 sea considerado una comorbilidad asociada a la obesidad.

La "prediabetes" es el término utilizado para individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios para la diabetes, pero que son demasiado altos para ser considerados normales (Buysschaert et al. 2011). Los pacientes con prediabetes se definen por la presencia de glucemia basal alterada y/o intolerancia a la glucosa y/o HbA1c 5,7-6,4%. La prediabetes no debe considerarse como una entidad clínica por derecho propio sino más bien como un mayor riesgo de padecer diabetes y ECV. La prediabetes está también asociada con la obesidad (especialmente la obesidad abdominal o visceral), la dislipidemia (concentraciones plasmáticas de triglicéridos elevadas y/o de colesterol HDLc bajas), y la HTA.

La DM2 es una enfermedad en la cual diversos factores genéticos y ambientales pueden dar lugar a la pérdida progresiva de masa de la célula β y/o de su función, lo cual se manifiesta clínicamente como hiperglucemia. Una vez que la hiperglucemia ocurre, los pacientes pueden desarrollar complicaciones crónicas macro y microvasculares si no se asegura un buen grado de control glucémico, también llamado control metabólico (American Diabetes Association 2020). El diagnóstico se establece con uno de los siguientes 4 criterios: Glucemia basal ≥ 126 mg/dl tras 8 horas de ayuno, glucemia ≥ 200 mg/dl tras sobrecarga oral de glucosa con 75 g., HbA1c $\geq 6,5\%$ o en un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica una glucosa al azar del plasma ≥ 200 mg/dl (American Diabetes Association 2020).

2.1.3. Dislipemia, hipertensión arterial y síndrome metabólico

El término dislipidemia es un término general aplicado a cualquier anomalía de los valores plasmáticos de las lipoproteínas que transportan al colesterol y los triglicéridos (Ryan A et al. 2018). En el SM, la resistencia a la insulina y la obesidad se combinan para causar una hipertrigliceridemia leve o moderada, bajos niveles de HDLc y preponderancia de las partículas de LDLc pequeñas y densas, defectos que contribuyen de manera significativa al incremento de riesgo de ECV. La menor actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), una enzima insulina-sensible, es en parte responsable de la disminución del aclaramiento de los triglicéridos, y de la producción disminuida de las partículas de HDLc. El aumento de las partículas pequeñas y densas de LDLc, con mayor poder aterogénico, es un acontecimiento consecuente (Ruotolo et al. 2002).

La HTA en el SM se define como cifras $\geq 130/85$ mm Hg de presión arterial (sistólica y diastólica), según los criterios más aceptados. El aumento de la presión arterial en el SM constituye otro importante factor de riesgo cardiovascular. El exceso de peso, especialmente asociado con mayor grasa visceral, es una causa importante de HTA. Los principales factores implicados en el aumento de la tensión arterial en la obesidad son (a) la compresión física de los riñones por la grasa, (b) la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (disminuye la eliminación de sodio o natriuresis), y (c) el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático. Cuando la obesidad se prolonga en el tiempo y se desarrolla lesión de órgano diana, especialmente lesión renal, la HTA de la obesidad llega a ser más difícil de controlar, requiriendo a menudo tratamiento con múltiples fármacos antihipertensivos y el control de otros factores de

riesgo, incluyendo dislipidemia, resistencia a la insulina, diabetes mellitus e inflamación (Hall 2015).

2.2. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

Los microbios que residen en el aparato digestivo, denominados microbiota gastrointestinal, representan un campo de estudio en continua expansión en los últimos años, atribuyéndoles implicaciones en salud y enfermedad. Dicha microbiota difiere en cada una de sus partes anatómicas, siendo en el intestino grueso donde se encuentra la mayor densidad microbiana (Figura 1). En el intestino grueso la microbiota está dominada por bacterias, pero también hay arqueas, hongos (levaduras) y protozoos. Además, existe una gran diversidad; se calcula que hay más de 500 especies ocupando ese hábitat, de manera que, en su conjunto, dan lugar a un ecosistema extraordinariamente maduro y, por tanto, resistente a la inducción de cambios desde el exterior; es lo que se denomina la homeostasis intestinal. Dentro de los grupos bacterianos que habitan en el intestino grueso, los más abundantes pertenecen a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, (35% del total en cada caso), seguidos por las Actinobacterias, que serían algo menos del 10%. La inmensa mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas (Suárez JE et al. 2015).

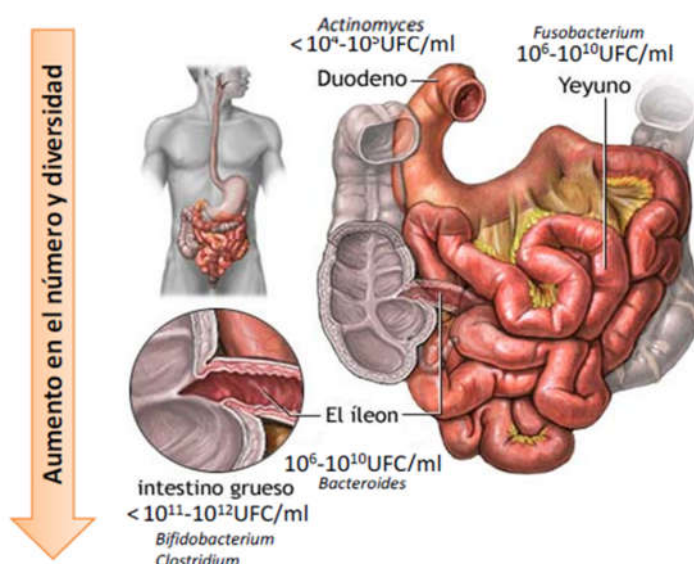


Figura 1. Distribución de la población bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal (modificado de O'Hara et al. 2006).

La composición de la microbiota gastrointestinal cambia con la edad del huésped. Se ha descrito la presencia de microorganismos en el semen, la placenta, el líquido amniótico, la sangre del cordón umbilical y el meconio, lo que sugiere que la colonización del feto se inicia intra-útero, aunque esto es todavía objeto de debate en la comunidad científica. En la actualidad, está bien descrito y documentado que el tipo de parto (vaginal o por cesárea) es un determinante de la composición y riqueza de la microbiota (Mesa et al. 2020). Además, la elección de la dieta (leche materna o de fórmula) después del nacimiento influye en el proceso de colonización en el recién nacido. Con la edad, la introducción del alimento sólido aporta una mayor complejidad a la microbiota. Asimismo, las hormonas sexuales en la pubertad introducen características relacionadas con la especificidad de género. Finalmente, en adultos, la microbiota gastrointestinal crece en riqueza y complejidad, formándose un “robusto núcleo” de colonizadores permanentes que añaden flexibilidad y reducen la vulnerabilidad de la misma a los desafíos externos e internos. Este proceso de maduración de la microbiota se lleva a cabo en paralelo con el desarrollo de órganos del huésped, incluyendo el intestino, que se alarga con la edad, proporcionando nichos adicionales para que la microbiota se amplíe en número y diversidad (Kundu et al. 2017), lo que se ha asociado con un estado metabólico más saludable (Rastelli et al. 2019, Dao et al. 2016). En el estado adulto, la composición de la microbiota gastrointestinal puede sufrir múltiples modificaciones, principalmente en relación a patrones dietéticos (Louis-Jean et al. 2019, Cani 2019), tratamiento farmacológico (Vich et al. 2020), e infecciones intestinales.

2.3. RELACIÓN ENTRE EL SÍNDROME METABÓLICO Y LA MICROBIOTA INTESTINAL

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la alteración de la microbiota gastrointestinal, denominada disbiosis, juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la inflamación sistémica asociada a la obesidad (Backhed et al. 2004, 2007 y Turnbaugh et al. 2006).

En este contexto, se ha descrito que existe una disminución de la proporción de *Bacteroidetes* / *Firmicutes* en sujetos obesos comparados con sanos (Turnbaugh et al. 2009) y que la baja riqueza de genes microbianos es un buen marcador de SM (Le Chatelier et al. 2013). Hace más de una década que se describió *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*), una bacteria anaerobia productora de mucílago (Derrien et al. 2004), que actualmente se considera un

probiótico natural, por lo que el aumento de la presencia de esta bacteria en el colon se ha relacionado con efectos beneficiosos en la salud del huésped (Zhou et al. 2019).

Se ha descrito que la presencia de *A. muciniphila* pudiera estar asociada con un estado metabólico saludable en personas con sobrepeso y obesidad, de acuerdo con resultados previos en estudios murinos (Dao et al. 2016). Así, en humanos, se ha descrito una disminución de la población de *A. muciniphila* en pacientes prediabéticos comparados con sujetos con metabolismo glucídico normal (Zhang et al. 2013). Además, se ha observado una mayor abundancia de *A. muciniphila* en sujetos con alta riqueza de genes bacterianos, que se asocia con un estado metabólico más saludable, en población francesa y danesa (Le Chatelier et al. 2013, Dao et al. 2016). Recientemente, se ha descrito que el ayuno islámico, una forma de ayuno intermitente, conduce a un aumento en el grupo de *A. muciniphila* y *B. fragilis* (Özkul C et al. 2019). Sin embargo, otros estudios han demostrado un aumento de la presencia de *A. muciniphila* en la DM2 (Qin et al. 2012).

Con respecto al SM, no se ha descrito la existencia de una alteración en el tipo y número de las especies bacterianas; sino que, aun no evidenciándose esta disbiosis, puede existir una anomalía de la funcionalidad de la microbiota (Das et al. 2019). Aunque los procesos por los cuales la microbiota gastrointestinal participa en el desarrollo del SM no están claros, se han propuesto posibles mecanismos en la relación a la alteración de la funcionalidad de la microbiota gastrointestinal en pacientes con SM.

2.3.1. Lipopolisacárido bacteriano

Una de las principales funciones de la microbiota gastrointestinal es la de fortificación de la barrera intestinal, evitando de esta forma que el organismo entre en contacto con productos bacterianos. La alteración de la microbiota gastrointestinal es capaz de promover un estado de inflamación sistémica de bajo grado, resistencia a la insulina e incrementar el riesgo cardiovascular a través de mecanismos que incluyen la exposición a productos bacterianos, principalmente debido a una alteración de la barrera intestinal. Uno de los componentes bacterianos más estudiados es el lipopolisacárido (LPS), componente de la pared de las bacterias Gram negativas. Hoy en día, se acepta la hipótesis de que el aumento de los niveles de LPS en el suero de los individuos produce una endotoxemia metabólica capaz de modular citoquinas proinflamatorias, así como la glucosa y el metabolismo lipídico en el hígado o en el tejido adiposo. Existen evidencias

científicas que avalan la contribución del LPS en la DM2 y en la obesidad. En ratones, el tratamiento con una dieta rica en grasas incrementa la proporción de bacterias Gram negativas en el intestino, así como los niveles de endotoxina circulantes. Cuando se les infunde LPS crónicamente a los ratones, éste causa obesidad leve y resistencia a la insulina (Cani 2007). En humanos, se ha observado que altas concentraciones de la proteína de unión al lipopolisacárido (LPB), considerada un marcador subclínico de la endotoxemia, están asociadas a obesidad, SRI y DM2 (Sun et al. 2010).

En resumen, el LPS produce una endotoxemia capaz de modular las citoquinas proinflamatorias y alterar el metabolismo de la glucosa y los lípidos en el hígado y el tejido adiposo (Cani et al. 2007, Lassenius et al. 2011).

2.3.2. Ácidos grasos de cadena corta

Una de las principales funciones de la microbiota gastrointestinal es el aumento de la disponibilidad energética al transformar la energía no digestible de la fibra en nutrientes absorbibles. Cambios en la microbiota resultan en una modificación de la capacidad de fermentación de los hidratos de carbono y como consecuencia se produce una modificación en la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico.

Los AGCC pueden interaccionar con receptores acoplados a proteínas G (Gpr41 y Gpr43) promoviendo la absorción de energía y/o la síntesis de triglicéridos y pudiendo además afectar la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Samuel et al. 2008, Maslowski et al. 2009). Una modificación en el perfil de AGCC, como consecuencia de una disbiosis, podría tener una importante implicación en el desarrollo de la DM2. En este sentido, algunos estudios han descrito que sujetos con DM2 tienen una menor proporción de especies productoras de butírico (Qin et al. 2012).

Zhao y colaboradores ha descrito que en ratones una mayor presencia y diversidad de AGCC, producidos por la degradación de fibra no absorbible, se asocia a una mejoría en los niveles de hemoglobina A1c. Esto se puede justificar, en parte, a través de una mayor producción de GLP-1 (péptido similar a glucagón tipo 1), el cual constituye hoy en día uno de los tratamientos más usados en la terapia de la DM2 (Zhao et al, 2018).

Otro mecanismo de los AGCC descrito en los últimos años, es su papel como moduladores epigenéticos, a través de la re-programación de la maquinaria transcripcional de la célula en

respuesta a estímulos ambientales, con implicaciones potenciales sobre el estado de salud y el desarrollo de enfermedades (Cuevas Sierra et al. 2019). En un estudio en animales, la exposición de organoides ileales de ratón a AGCC moduló la expresión de histona desacetilasas, factores de transcripción y genes involucrados en el metabolismo lipídico celular y la saciedad (Lukovac et al. 2014).

2.3.3. Ácidos biliares y N-óxido de trimetilamina

Los ácidos biliares son los productos finales del catabolismo del colesterol. El ácido cólico y el ácido chenodeoxicólico son los principales ácidos biliares primarios sintetizados en el hígado, y se conjugan con taurina o glicina para la secreción en la bilis. Las sales biliares forman micelas mixtas con fosfolípidos y colesterol y se almacenan en la vesícula biliar, secretadas en el TGI para facilitar la digestión y absorción de nutrientes (Chiang et al. 2013). En el TGI estos ácidos biliares primarios son modificados por la microbiota intestinal dando lugar a los ácidos biliares secundarios. La mayoría de los ácidos biliares (95%) se reabsorben en el íleon y se transportan de vuelta al hígado a través de la circulación sanguínea portal, para luego ser re-secretados, en el proceso conocido como la circulación enterohepática. Estos ácidos biliares secundarios pueden llegar a sufrir nuevas transformaciones por parte de la microbiota dando lugar a los ácidos biliares terciarios.

Hoy en día se sabe que, además de las funciones en el proceso de digestión, los ácidos biliares actúan como moléculas de señalización endocrina que afectan la fisiología del huésped mediante la activación de receptores de ácidos biliares como el receptor X farnesoide (FXR) y el receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G (TGR5). FXR está ubicado en hepatocitos y enterocitos en el intestino delgado distal y en el colon y TGR5 se expresa en células enteroendocrinas, la vesícula biliar y en las células epiteliales de los conductos biliares. La interacción entre los ácidos biliares y la microbiota gastrointestinal vía FXR y TGR5 es fundamental para el metabolismo del huésped y los ácidos biliares regulan vías metabólicas en diferentes tejidos. La modulación de la microbiota gastrointestinal y con ello los perfiles de ácidos biliares, a través de prebióticos, probióticos y trasplante fecal, podría ser un enfoque razonable en el tratamiento del SM (Molinaro et al. 2018).

Por otra parte, el N-óxido de trimetilamina (TMAO), es un compuesto que se forma en el intestino por la degradación bacteriana de diversos productos de la dieta que contienen colina,

como pescado, huevos y legumbres. Recientemente se ha descrito una relación directa entre la los niveles séricos elevados de TMAO y un aumento del riesgo cardiovascular, en concreto con enfermedad coronaria, ictus, hipercoagulabilidad, inflamación vascular e insuficiencia cardiaca (Org 2017, Tang 2014). También se ha descrito que niveles elevados de TMAO están asociados con la insuficiencia renal crónica e incluso con la disminución de la supervivencia en este grupo de pacientes (Tang 2015).

2.4. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO

El SM es un grave problema de salud en la población a nivel mundial. Actualmente el tratamiento se basa en cambios en el estilo de vida a través de medidas higiénico-dietéticas (la dieta y el ejercicio) y tratamiento clínico. El manejo clínico del SM es difícil y supone un reto para la sociedad. En la actualidad se usan fármacos para tratar los componentes del SM de forma separada (por ejemplo para disminuir la glucosa sanguínea o los triglicéridos) y no como si fuese una sola entidad.

Sobre la base de estudios en animales y humanos, la ingesta dietética parece ser un importante regulador a corto y largo plazo de la estructura y función de la microbiota gastrointestinal (Lynch et al. 2016). Por lo tanto, promover cambios en la microbiota gastrointestinal combinado con una dieta mediterránea adecuada podría desempeñar un papel importante para garantizar la eficacia y el éxito de la reducción de los componentes del SRI como si fuesen una sola entidad y evitar el desarrollo de DM2. Asimismo, es un área de creciente interés el estudio de los potenciales beneficios de la adición de probióticos a pacientes con SM; aunque todavía existe un número muy pequeño de estudios aleatorizados, clínicamente controlados que evalúan los efectos de los probióticos sobre los parámetros del SM.

El término “probiótico” se refiere a microorganismos que ejercen efectos beneficiosos sobre el huésped administrados en cantidades adecuadas (Hill et al. 2014). Idealmente, los probióticos deben demostrar su viabilidad y actividad en humanos (Plaza-Díaz et al. 2018). Los probióticos se usan para tratar la disbiosis intestinal restaurando la composición y funcionalidad de la microbiota gastrointestinal y así mejorar determinadas condiciones patogénicas, a través de mecanismos no bien elucidados, tales como: la exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocinas; la modulación de actividades enzimáticas fecales asociadas con la

metabolización de sales biliares, la inactivación de carcinógenos y otros xenobióticos y la producción de ácidos grasos de cadena corta, entre otros (Plaza-Díaz et al. 2019).

La evidencia científica disponible con respecto a la efectividad de los probióticos en el tratamiento del SM, según definición de la IDF, es contradictoria (Anexo 1). Actualmente, hasta donde sabemos, no se ha realizado un meta-análisis en pacientes con un diagnóstico específico de SM, excluyendo a las personas con DM2.

Los ensayos clínicos aleatorizados y controlados por placebo (ECA) realizados en humanos para determinar la efectividad del uso de probióticos en el tratamiento del SM parecen indicar que los probióticos pueden mejorar discretamente algunos de los componentes clínicos del SM, así como algunos biomarcadores inflamatorios asociados con el síndrome. Aunque significativos, estos efectos supuestamente positivos son clínicamente no relevantes (Tenorio-Jiménez et al. 2020). Aunque un diseño cruzado es un enfoque más apropiado para determinar los beneficios para la salud de las intervenciones clínicas, la mayoría de los estudios realizados presentan un diseño paralelo.

Es importante destacar la heterogeneidad de los estudios realizados, en términos de población, cepa y género de probióticos, dosis administradas y duración de las intervenciones. Se han utilizado diferentes cepas y, además, algunos de los estudios clínicos utilizaron una mezcla de diferentes cepas probióticas. Es bien sabido que los efectos probióticos son fuertemente dependientes del tipo de la cepa utilizada. Las cepas utilizadas en los ECA ha sido seleccionadas principalmente debido a efectos beneficiosos previos descritos en animales; sin embargo, estos resultados no siempre se pueden transferir a estudios en humanos. Además, el rango de dosis, que varía de 10^8 a 10^{11} UFC, y la forma de administración (queso, yogur y leche o cápsula probiótica) es otra variable que genera heterogeneidad. Con respecto a los sujetos incluidos, algunos de los estudios solo reclutaron mujeres, mientras que el resto estudió los probióticos en hombres y mujeres en diferentes proporciones. Desde un punto de vista clínico, puede haber un riesgo cardiovascular diferente en mujeres que en hombres con SM; sin embargo, las implicaciones de este problema son actualmente desconocidas (Tenorio-Jiménez et al. 2020).

Además, el tiempo de exposición es también un factor importante para determinar los efectos de los probióticos. Tiempos de intervención cortos (3 a 6 semanas) podrían no ser suficientes para demostrar cambios en algunos de los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y resistencia a la insulina, como la HbA1c, el principal marcador de control de la diabetes en la

práctica clínica. Esto se debe al hecho de que HbA1c depende de la vida útil de los eritrocitos y refleja el control glucémico durante los últimos dos o tres meses (Tenorio-Jiménez et al. 2020).

Por otro lado, en la mayoría de los ECA no se estudia la composición de la microbiota gastrointestinal. Como ya se ha descrito, hoy en día, existe evidencia científica sobre la implicación de la microbiota intestinal en el desarrollo de SM (Rastelli et al. 2019). Por lo tanto, la determinación de la composición gastrointestinal debe implementarse en ECA con probióticos. En este sentido, la metagenómica puede proporcionar información importante sobre los microorganismos de la ecología funcional.

Para determinar el efecto de los probióticos sobre el SM son necesarios más ECA diseñados de forma apropiada. Para ello, los ECA han de realizar una correcta estimación del tamaño y poder estadístico, teniendo en cuenta que la duración de la intervención, el tipo de cepa utilizada, la dosis y el modo de administración deben justificarse y controlarse cuidadosamente pues juegan un papel determinante en los resultados obtenidos. Finalmente, se debe tener especial cuidado en la interpretación de dichos resultados para no confundir la significación estadística con la relevancia biológica o la fuerza de la evidencia.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el objetivo principal de esta tesis es determinar el efecto de una cepa probiótica (*L. reuteri V3401*) junto con dieta y ejercicio, en el tratamiento del SM, realizando para ello un estudio clínico aleatorizado, cruzado, doble ciego y controlado por placebo.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

La administración de *L. reuteri* V3401 a humanos adultos diagnosticados de SM junto con medidas higiénico-dietéticas producirá una mejoría de los parámetros que definen el SM.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de un liofilizado de *L. reuteri* V3401 en pacientes con SM sobre marcadores del SM (parámetros antropométricos, bioquímicos, de riesgo cardiovascular, biomarcadores de inflamación y esteatosis hepática), composición de la microbiota intestinal y sobre otros posibles metabolitos implicados.

3.2.2. Objetivos específicos

- a)** Determinar las modificaciones en parámetros antropométricos y composición corporal por efecto de la ingesta de la cepa probiótica.
- b)** Determinar las modificaciones producidas en el metabolismo de los hidratos de carbono por la cepa probiótica.
- c)** Determinar las modificaciones producidas en el metabolismo lipídico.
- d)** Determinar el cambio en los marcadores inflamatorios debido al efecto de la cepa probiótica.
- e)** Determinar la modificación de la composición de la microbiota intestinal por efecto de la cepa probiótica y su relación con el SRI.

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente tesis doctoral describe un estudio de intervención nutricional con una cepa probiótica aleatorizado, controlado por placebo, doble ciego, tipo cruzado de 2 vías. Se incluyeron pacientes adultos con SM según criterios IDF. Se realizó un primer periodo de lavado (2 semanas) y a continuación se llevó a cabo la intervención durante 12 semanas, tras las cuales se realizó un segundo lavado (6 semanas), y se inició un segundo periodo de intervención de 12 semanas. El probiótico y el placebo fueron administrados en forma de liófilo en el interior de una cápsula. Las cápsulas para el probiótico y el placebo eran externamente indistinguibles, La dosis diaria del probiótico fue de 10^{10} ufc/día. La cepa probiótica fue facilitada gratuitamente por la empresa BIOSEARCH LIFE en una forma farmacéutica apropiada (cápsulas). A los participantes se les indicó que siguieran una dieta libre de alimentos a los que se les hubiese incluido específicamente probióticos y/o prebióticos, dos semanas antes de empezar la intervención (primer periodo de lavado) y durante todo el periodo que duró dicha intervención. Además, a los participantes se les prescribió dieta hipocalórica y actividad física. En la Figura 2 se muestra el diseño experimental del estudio.

Se tomaron muestras de sangre y de heces de los participantes a lo largo de la intervención (Figura 2). La extracción de sangre se realizó en ayunas, al inicio y al final de cada período de intervención (t1, t3, t4 y t6). Asimismo, se tomaron muestras de heces al inicio, a las 0, 6, 12, 14, 20 y 26 semanas (t1, t2, t3, t4, t5 y t6 respectivamente). La toma de sangre se realizó en un tubo con EDTA de 5 ml, a partir de los cuales se obtuvo 2ml de plasma por centrifugación para la determinación de los biomarcadores de inflamación, de esteatosis hepática y del perfil metabólico. La toma de heces la realizaron los participantes en su casa, en botes estériles suministrados por el investigador. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su análisis.

El estudio realizado se llevó a cabo conjuntamente por miembros de los Servicios de Endocrinología y Nutrición (ENCHJ) y Aparato Digestivo del Complejo Hospitalario de Jaén (ADCHJ), por miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la UGR y por miembros del Servicio de Microbiología del Hospital San Cecilio (MHUSC). La selección, control clínico y antropométrico, se realizó por los miembros del Servicio de ENCHJ y la determinación de

esteatosis hepática mediante ecografía por miembros del Servicio de ADCHJ. La toma de muestras biológicas (sangre y heces) se realizó en el CHJ. La determinación de la composición de la microbiota gastrointestinal se realizó por miembros del MHUSC, conjuntamente con los miembros de la UGR. Los análisis de biomarcadores de inflamación, así como el estudio estadístico fueron realizados por los miembros de la UGR.

En todo momento, el ensayo clínico se realizó de acuerdo con las Normas de Helsinki y fue previamente aprobado por el comité de ética del CHJ, siguiendo las normas de investigación internacional, nacional y autonómica para las investigaciones que utilizan muestras procedentes de seres humanos. El Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (BBSSPA) llevó a cabo la gestión de muestras e información asociada al desarrollo del proyecto de investigación. A todos los participantes se les presentó el proyecto, se les facilitó la hoja de información del BBSSPA y se les ofreció participar en el mismo. Una vez aceptada su participación, se obtuvo su consentimiento informado, según el modelo del BBSSPA, por escrito. El desarrollo de este proyecto de investigación ha supuesto el acceso y uso de información confidencial, por lo que los datos sujetos a investigación se trataron de forma anónima, de acuerdo con los protocolos establecidos por el BBSSPA. Asimismo, el estudio fue registrado en la base de datos *ClinicalTrials.gov* por la empresa promotora, teniendo asignado el siguiente código: NCT02972567.

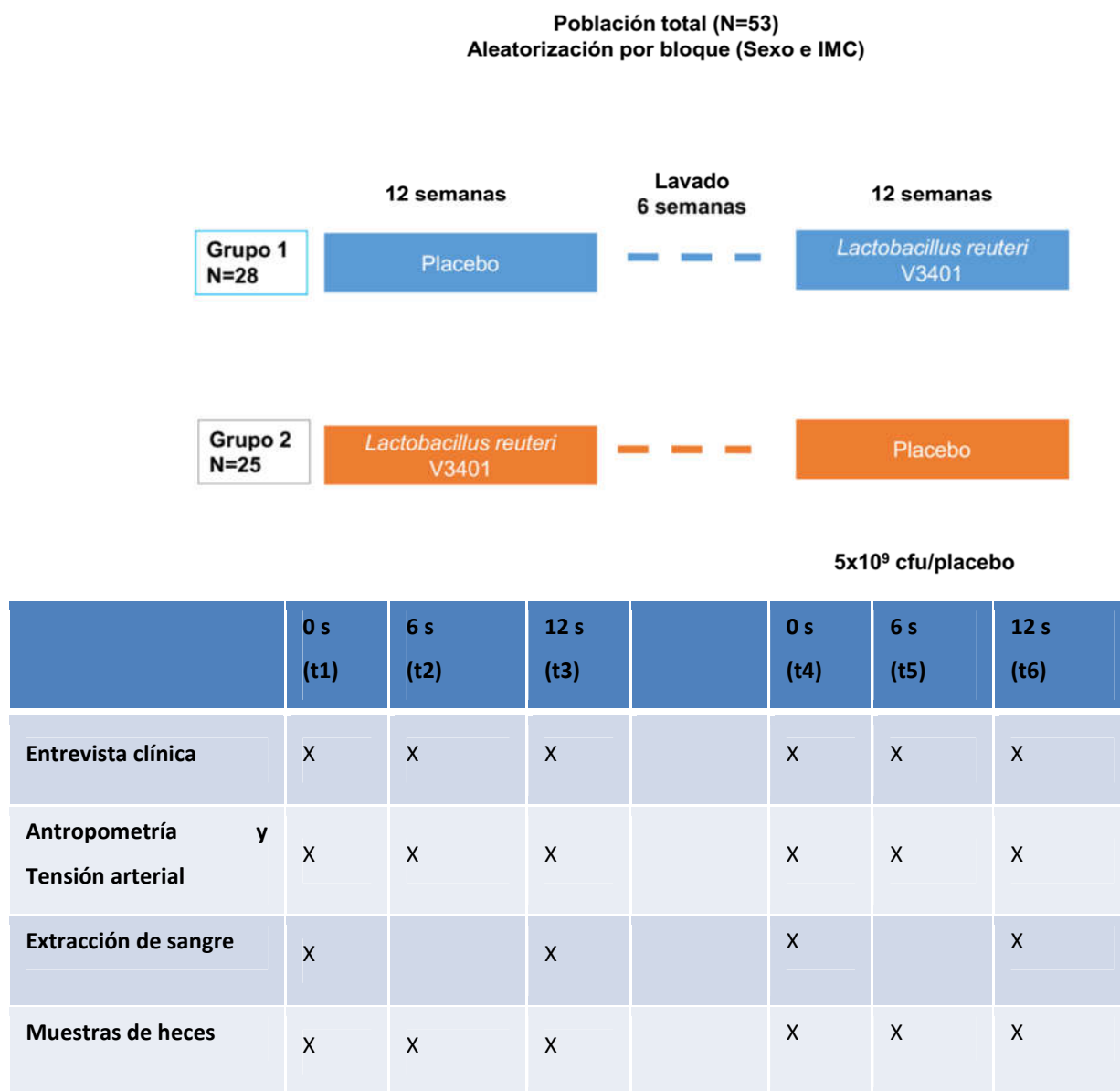


Figura 2. Esquema del diseño experimental

4.2. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño muestral se calculó basándose en el valor medio y rango de valores mínimo y máximo de LPS en plasma. Para poder asegurar una potencia del estudio del 90% y un riesgo del 5% se necesitan 32 sujetos. A este número se le han de sumar aproximadamente un 10% en previsión de los posibles casos de abandono o retirada. En total se incluyeron 53 sujetos.

4.3. SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

Los participantes fueron seleccionados entre los individuos que acudieron a las Consultas Externas del Servicio de ENCHJ y que cumplieron los criterios de inclusión y no los de exclusión, que se detallan a continuación.

Criterios de inclusión:

Edad comprendida entre 18 y 65 años y pertenecientes a la raza caucásica con diagnóstico de síndrome de resistencia a la insulina, según criterios IDF. Es necesario la presencia del primer criterio más dos de los otros criterios:

- IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$. Cuando el IMC es menor, se tiene en cuenta la circunferencia de cintura (CC), atendiendo a los criterios de sexo y étnicos. CC para hombres $\geq 94\text{cm}$, CC para mujeres $\geq 80\text{cm}$. Si el sujeto tiene obesidad no es necesario el criterio de la circunferencia de cintura.
- Niveles de triglicéridos séricos $\geq 150\text{ mg/dl}$
- Niveles de HDLc séricos $< 40\text{ mg/dl}$ ($1,03\text{ mmol/l}$) en los hombres y $< 50\text{ mg/dl}$ ($1,29\text{ mmol/l}$) en las mujeres.
- Presión arterial sistólica $\geq 130\text{ mm Hg}$ o diastólica $\geq 85\text{ mm Hg}$ o tratamiento previo de hipertensión.
- Niveles de glucosa en sangre $\geq 100\text{ mg/dl}$ ($5,6\text{ mmol/l}$) sin diagnóstico previo de diabetes tipo 2.

Criterios de exclusión:

- a) Participantes que presenten insuficiencia renal o hepática
- b) Participantes con un diagnóstico de diabetes.
- c) Participantes con enfermedades que condicionen inmunosupresión
- d) Participantes que presenten serologías positivas para virus hepáticos
- e) Que se encuentre en tratamiento con antihipertensivos: betabloqueantes, antagonistas del receptor de angiotensina 2 (ARA 2), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs).
- f) Participantes con tratamiento con hipolipemiantes y/o hipoglucemiantes
- g) Participantes con tratamiento con fármacos que aumenten las enzimas hepáticas, tales como amiodarona, maleato de perhexelina y 4, 4'-dietiaminoetoxihexestrol, estrógenos sintéticos, tamoxifeno, corticoesteroides, ácido acetilsalicílico, ácido valproico, tetraciclinas, agentes antivíricos (zidovudina, zalcitabina, didanosina), entre otros.

- h) Que presente valores elevados de la proteína C reactiva (PCR o VSG).
- i) Que consuman alcohol en cantidad superior a 40 g/d u otros hepatotóxicos.

4.4. ENTREVISTA CLÍNICA, DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y CLÍNICOS

Se realizó una entrevista clínica, previa a la inclusión en el estudio y al inicio y al final de cada período de intervención. Se recogieron datos clínicos y los correspondientes a la exploración clínica y antropometría: peso, talla, IMC, CC, TA.

Inicialmente se les administró una dieta hipocalórica individualizada con aporte calórico: 25 kcal/kg de peso ajustado para un IMC de 25 kg/m² y día. Además a los participantes se les dio recomendaciones nutricionales, de actividad física (150 minutos a la semana) y de otros hábitos de vida saludable junto con las recomendaciones obligadas por la intervención, haciendo énfasis en algunos productos que contienen prebióticos y/o probióticos que debían evitarse. En las visitas sucesivas se realizó educación con medidas de refuerzo de las recomendaciones higiénico-dietéticas.

4.5. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y DE ESTEATOSIS HEPÁTICA

Se realizó la detección simultánea de los biomarcadores utilizando los kits de ensayo MILLIPLEXMAP (Millipore Corp, Billerica, MA) y la tecnología de detección Luminex xMAP, que permite determinar cuantitativamente mediante ELISA varios biomarcadores de forma simultánea utilizando una cantidad de muestra muy reducida (25-50µl de plasma o suero). Se utilizaron los kits para la determinación de molécula de adhesión vascular soluble-1 (sVCAM), molécula de adhesión intercelular soluble-1 (sICAM), mieloperoxidasa (MPO) y selectina, adiponectina, PAI y resistina, y las interleuquinas IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), leptina y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). La determinación de la concentración de LPS y de la LPB se realizó mediante ELISA sencillo.

Se estimó si los participantes padecían esteatosis mediante ecografía tanto al inicio de los dos períodos de intervención, así como al final del segundo período de intervención. Esta exploración fue realizada por dos Facultativos Especialistas de ADCHJ expertas en la técnica que siguieron a los mismos participantes que les fueron asignados.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

En la UGR se analizaron las muestras de heces mediante la obtención del DNA bacteriano a partir de ellas, para posteriormente amplificar la región V3-V4 del gen 16SRNA para su secuenciación y determinación de la composición de la microbiota intestinal a la mitad y el final de cada período de intervención (Figura 2). Sin embargo, no se pudo determinar la presencia específica de la cepa *L. reuteri* V3401 en muestras fecales debido a la falta de cebadores específicos para esta cepa.

Respecto al análisis taxonómico, se empleó el programa "*Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*" (QUIIME 2) (Boylen et al. 2018). En primer lugar se eliminaron las redundancias y se realizó la eliminación de secuencias generadoras de "ruido" (*denoising*) y el posterior agrupamiento con lo que se utilizó la herramienta DADA2 implementada en QUIIME2. Esta herramienta nos permitió obtener las variantes de secuencia de amplicones (*ASV-amplicon sequencing variants*) en lugar de los tradicionales OTUs (unidades operacionales taxonómicas). Aquellas ASV con una proporción relativa menor del 0,1% fueron eliminadas, obteniéndose un total de 2.015 ASV, pero con un impacto muy bajo en el número total de datos. Para la clasificación taxonómica se usó la base de datos *GreenGenes* (versión 13.8), junto con el algoritmo de Bayes.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los parámetros antropométricos, bioquímicos y los biomarcadores inflamatorios, se presentan los resultados como la media $\pm$ la desviación estándar (DE), a menos que se indique lo contrario. Para las variables que no seguían una distribución normal, se aplicó la transformación logarítmica (insulina, índice HOMA, HbA1c, colesterol total, triglicéridos, alanina aminotransferasa (GPT), gamma glutamiltransferasa (GGT), proteína C reactiva (PCR), IL-6, IL-8, adiponectina, resistina, HGF, sICAM, sVCAM y LBP) o la transformación inversa [HDLc, aspartato aminotransferasa (GOT)].

Solo se consideraron pacientes con menos de 5 datos faltantes, lo que resultó en un número final de 34 pacientes. Los datos faltantes en estos pacientes fueron imputados usando el análisis de componentes principales y regresión de puntaje recortado (Arteaga et al. 2002). Los efectos del tratamiento en parámetros antropométricos, bioquímicos y en biomarcadores

inflamatorios se evaluaron de acuerdo con el enfoque descrito por Wellek et al. 2012. Se llevaron a cabo dos tests: (i) un test previo para determinar la importancia de los efectos de arrastre, y (ii) un test para determinar la importancia de los efectos de tratamiento. Los efectos del tratamiento se consideraron significativos para aquellos marcadores para los cuales la hipótesis nula de la prueba previa no fue rechazada ($p < 0,05$), confirmando que el marcador presentó diferencias estadísticamente significativas solo debido a los efectos del tratamiento. Los cálculos del valor p se confirmaron con diferentes enfoques de análisis multivariante de última generación, incluyendo el análisis de la varianza multivariante (MANOVA) (Mardia et al. 1979), el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (Barker et al. 2003), y el análisis simultáneo de componentes ANOVA (ASCA) (Smilde et al. 2005).

La herramienta MEDA (<https://github.com/josecamachop/MEDA-Toolbox>) y la herramienta MANCOVAN (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27014-mancovan>) en Matlab (Mathworks) se utilizaron para realizar el análisis estadístico.

Para el análisis de microbiota intestinal, las secuencias generadas fueron normalizadas por rarefacción (Figura 3). La diversidad alfa se midió por medio del Índice de Shannon, mientras que se utilizó Unifrac, tanto ponderada como no ponderada, para determinar la diversidad beta. Al comparar las proporciones de incremento relativo de bacterias antes y después del tratamiento (delta), se utilizó una prueba de rango con signo de Wilcoxon por parejas. Los valores de p fueron ajustados por *False discovery rate*-FDR (valores q).

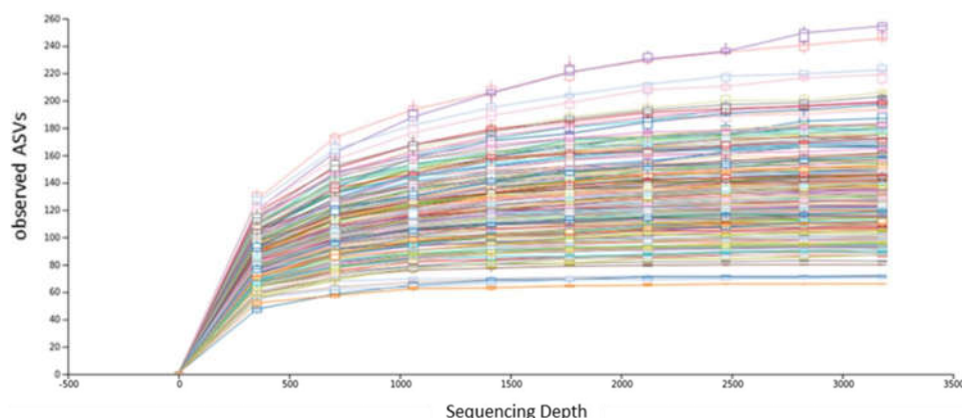


Figura 3. Curvas de rarefacción

Para una completa descripción del diseño del estudio ver Anexo 2.

5. RESULTADOS

El presente estudio de intervención incluyó un total de 53 voluntarios, divididos en dos grupos (grupo-1 y grupo-2) de forma aleatoria en función del IMC y del sexo, y se les asignó las cápsulas correspondientes al “set-1” o al “set-2”, respectivamente (Figura 2). El estudio se dividió en dos intervenciones, la primera se realizó de mayo a julio de 2016, y tras doce semanas de intervención, hubo un periodo de lavado de 6 semanas, y a continuación se reanudó la intervención, en la que los individuos que habían recibido las cápsulas del set-1 ahora recibieron las del set-2 y viceversa. La segunda intervención se realizó entre los meses de septiembre y de diciembre de 2016. Completaron el estudio un total de 34 voluntarios.

Los grupos de los voluntarios iniciales quedaron de la siguiente forma:

Grupo-1: 28 voluntarios, 15 mujeres y 13 hombres, con una media $\pm$ DE de $47,9 \pm 10,6$ años de edad.

Grupo-2: 25 voluntarios, 14 mujeres y 11 hombres, con una media $\pm$ DE de $47,1 \pm 11,7$ años de edad.

Las cápsulas correspondientes al set-1 contenían el placebo o excipiente, mientras que las cápsulas correspondientes al set-2 contenían el probiótico. Hasta la finalización de los resultados estadísticos no se tuvo conocimiento de qué producto específico contenían las cápsulas, asegurando de este modo que los resultados obtenidos eran doble ciego. La duración promedio de la primera intervención fue de 84 días, y estuvieron un promedio de 3 días sin tomar el probiótico antes de la toma de muestra al final de la primera intervención. Con respecto a la segunda, duró un promedio de 85 días, y los voluntarios estuvieron un promedio de 3 días sin tomar el probiótico antes de la toma de muestra al final de la segunda intervención. Los probióticos fueron generalmente bien tolerados, no encontrándose efectos secundarios que obligaran a suspender el tratamiento.

5.1. PARÁMETROS CLÍNICOS, ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS

En la tabla 1 se muestran los valores para los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos a lo largo de la intervención. Tras el análisis de los datos, y teniendo en cuenta los efectos de arrastre, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros

estudiados entre los participantes que recibieron la cepa probiótica y/o el correspondiente placebo.

Tabla 1. Evolución de los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos a lo largo del estudio.

Variables	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Placebo		Probiótico		Probiótico		Placebo	
	t1	t3	t4	t6	t1	t3	t4	t6
Peso (kg)	109,0±26,6	105,7±26,2	101,5±24,5	101,1±24,2	103,5±15,3	96,6±16,2	93,9±16,8	92,0±17,3
IMC (Kg/m²)	38,8±7,23	37,6±7,2	36,8±6,8	36,6±6,7	38,3±7,3	35,7±7,1	34,6±6,9	33,8±6,6
TAS (mmHg)	137,7±16,9	133,3±15,4	133,1±20,4	132,2±14,6	139,0±22,7	120,0±16,1	131,3±20,0	131,4±18,7
TAD (mmHg)	84,3±9,6	82,0±7,7	81,7±11,0	82,1±10,5	88,0±14,3	78,2±10,4	78,9±12,4	81,6±11,2
Glucosa (mg/dl)	103,3±11,0	108,1±11,5	106,7±8,9	105,5±10,5	101,0±14,0	103,7±13,4	101,2±11,8	103,8±16,5
Insulina (mU/ml)	17,5±10,7	16,2±11,3	22,4±10,3	21,7±11,7	14,2±8,5	12,4±10,9	14,0±6,1	17,5±7,8
Índice HOMA	4,5±2,8	4,4±3,3	5,9±2,8	5,7±3,5	3,7±2,7	3,5±3,7	3,6±1,8	4,5±2,2
HbA1c (%)	5,6±0,4	6,0±2,2	5,4±0,3	5,5±0,3	5,7±0,4	5,9±1,8	5,5±0,3	5,4±0,4
Colesterol total (mg/dL)	232,4±43,0	207,1±36,0	202,8±45,8	224,2±45,5	233,4±46,5	203,6±37,9	209,6±58,1	220,9±53,8
Triacilgliceridos (mg/dL)	119,3±47,6	122,5±59,9	109,0±47,3	118,9±52,2	130,6±47,5	128,3±57,6	112,9±42,7	100,6±62,6
LDLc (mg/dL)	156,8±35,7	131,7±30,0	128,1±32,5	144,4±39,0	161,0±41,7	132,9±32,1	136,2±47,8	145,7±44,5
HDLc (mg/dL)	50,5±14,6	50,5±12,2	52,5±13,3	54,1±10,2	46,0±9,5	44,7±7,9	50,4±10,3	54,6±11,5

Media ± desviación estándar. IMC: Índice de masa corporal; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: Tensión arterial diastólica; LDLc: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; HDLc: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad. El grupo 1 comenzó la intervención recibiendo el placebo (t1 y t3) y posteriormente se cruzó para recibir la cepa probiótica (t4 y t6). El grupo 2 comenzó la intervención recibiendo la cepa probiótica (t1 y t3) y después recibió el placebo (t4 y t6).

5.2. BIOMARCADORES INFLAMATORIOS

Los resultados de los marcadores inflamatorios se describen en la Tabla 2. Entre los resultados obtenidos destaca el efecto de la cepa probiótica sobre los valores plasmáticos de IL-6 (Figura 4), los cuales disminuyeron por efecto del tratamiento. Esta disminución se observó en ambas intervenciones en el grupo que consumió la cepa probiótica (-0,21 en la primera intervención y -0,28 en la segunda intervención). Asimismo, se observó también una disminución de los niveles séricos de sVCAM en los participantes que recibieron la cepa probiótica en ambas intervenciones (Figura 4).

Tabla 2. Evolución de los marcadores inflamatorios a lo largo del estudio.

Variables	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Placebo		Probiótico		Probiótico		Placebo	
	t1	t3	t4	t6	t1	t3	t4	t6
PCR (mg/dL)	5,1±3,7	5,8±4,8	7,0±7,4	5,5±4,4	5,9±4,4	6,1±6,4	3,7±2,7	4,3±3,8
IL-6 (pg/mL)	2,9±1,8	3,3±2,4	3,1±1,9	2,6±2,00	2,1±1,3	1,8±1,2	1,4±0,8	1,7±1,0
IL-8 (pg/mL)	2,9±1,7	2,8±1,2	4,1±7,1	4,2±9,5	2,7±1,1	2,7±1,2	2,3±1,1	2,3±1,1
TNF-alfa (pg/mL)	4,7±2,5	4,9±2,6	4,6±2,1	3,5±1,7	4,1±1,9	4,2±2,1	3,05±1,24	3,3±2,0
Adiponectina (mg/L)	6,6±5,1	6,0±4,7	5,8±3,9	6,6±3,4	5,7±3,7	6,9±6,5	7,2±4,4	8,3±6,1
PAI1 (µg/L)	9,2±4,9	9,6±4,3	10,6±4,8	11,6±7,1	9,3±3,2	8,4±2,6	9,1±3,2	9,5±3,6
Pselectina (ng/mL)	46,8±19,7	46,7±21,2	49,3±22,9	63,5±38,3	48,1±16,7	40,5±11,5	60,7±35,4	58,1±21,7
Resistina (µg/L)	17,7±8,1	17,7±13,7	17,0±5,3	17,5±10,4	15,3±7,2	11,9±5,3	11,08±4,01	12,60±5,20
HGF (pg/mL)	161,1±97,9	155,7±93,6	131,5±65,9	162,5±88,3	175,1±75,1	170,2±72,7	160,5±68,8	158,0±57,5
Leptina (µg/L)	28,6±14,8	24,07±12,3	23,7±13,8	18,4±10,5	22,0±11,8	17,7±10,9	13,7±9,3	14,2±10,4
MCP-1 (pg/mL)	107,5±39,3	106,6±31,7	120,2±60,1	118,2±46,8	108,9±39,3	114,6±51,5	116,31±43,65	112,5±41,2
sICAM (ng/mL)	73,7±37,2	73,7±41,2	67,9±35,2	65,5±32,2	74,8±26,9	71,5±33,1	75,2±40,2	73,0±41,3
MPO (ng/mL)	17,7±6,0	20,0±10,7	20,7±13,2	30,5±21,2	15,6±7,8	18,1±13,0	17,3±12,4	19,5±10,3
sVCAM (ng/mL)	494,2±125,1	511,0±154,8	516,5±149,1	507,6±138,8	489,7±80,9	472,7±71,4	491,6±99,6	527,4±74,6
LPS (ng/mL)	285,8±107,2	277,9±116,4	312,2±126,0	326,2±166,0	321,8±105,4	316,8±124,0	309,9±136,7	308,7±131,4
LBP (ng/mL)	731,3±512,4	782,6±323,0	636,0±294,2	747,4±272,6	837,5±423,5	742,8±349,2	833,6±560,5	855,8±663,1

Media ± desviación estándar; PCR: proteína C reactiva; IL: interleuquina; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; PAI1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; sICAM: molécula de adhesión intracelular soluble 1; sVCAM: molécula de adhesión vascular soluble-1; MPO: mieloperoxidasa; LPS: lipopolisacárido; LBP: proteína de unión a lipopolisacáridos. El grupo 1 comenzó la intervención recibiendo el placebo (t1 y t3) y posteriormente se cruzó para recibir la cepa probiótica (t4 y t6). El grupo 2 comenzó la intervención recibiendo la cepa probiótica (t1 y t3) y después recibió el placebo (t4 y t6).

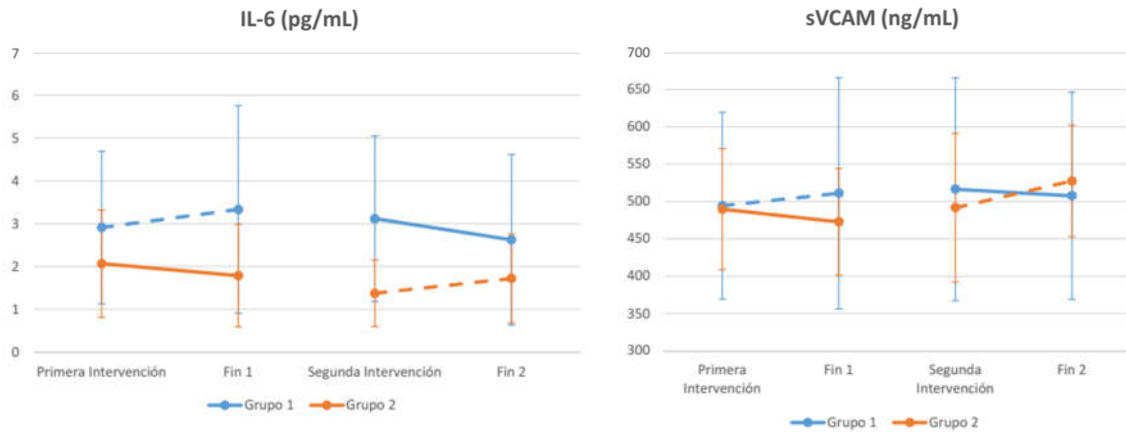


Figura 4. Evolución de los marcadores inflamatorios en el estudio. Los niveles de IL-6 y sVCAM fueron modificados por el consumo de probióticos ($p < 0.05$). Línea continua: grupo probiótico. Línea discontinua: grupo placebo. Grupo 1: color azul; Grupo 2: color naranja. IL: Interleuquina; sVCAM: molécula de adhesión vascular soluble-1. El grupo 1 comenzó la intervención recibiendo el placebo y posteriormente se cruzó para recibir la cepa probiótica. El grupo 2 comenzó la intervención recibiendo la cepa probiótica y después recibió el placebo.

5.3. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

En el estudio de la composición de la microbiota intestinal, se observa que al inicio del estudio, los filos más abundantes son *Firmicutes* y *Bacteroidetes* seguidos de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacteria* (Figura 5).

En cuanto a la diversidad bacteriana, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad alfa a lo largo del estudio, medido como el índice de Shannon (H) (diversidad intergrupos) (Figura 6), o en la diversidad beta (Unifrac) (diversidad intragrupos) (Figura 7).

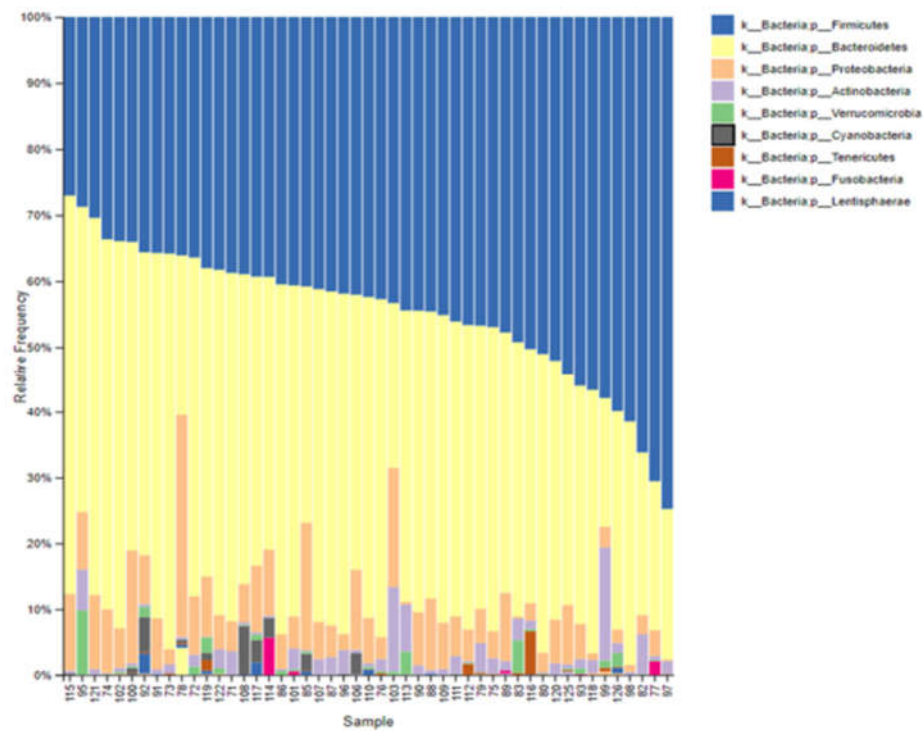


Figura 5. Composición taxonómica de las comunidades bacterianas al inicio del estudio. Las barras representan la abundancia relativa de bacterias a nivel filo. Cada columna representa un participante.

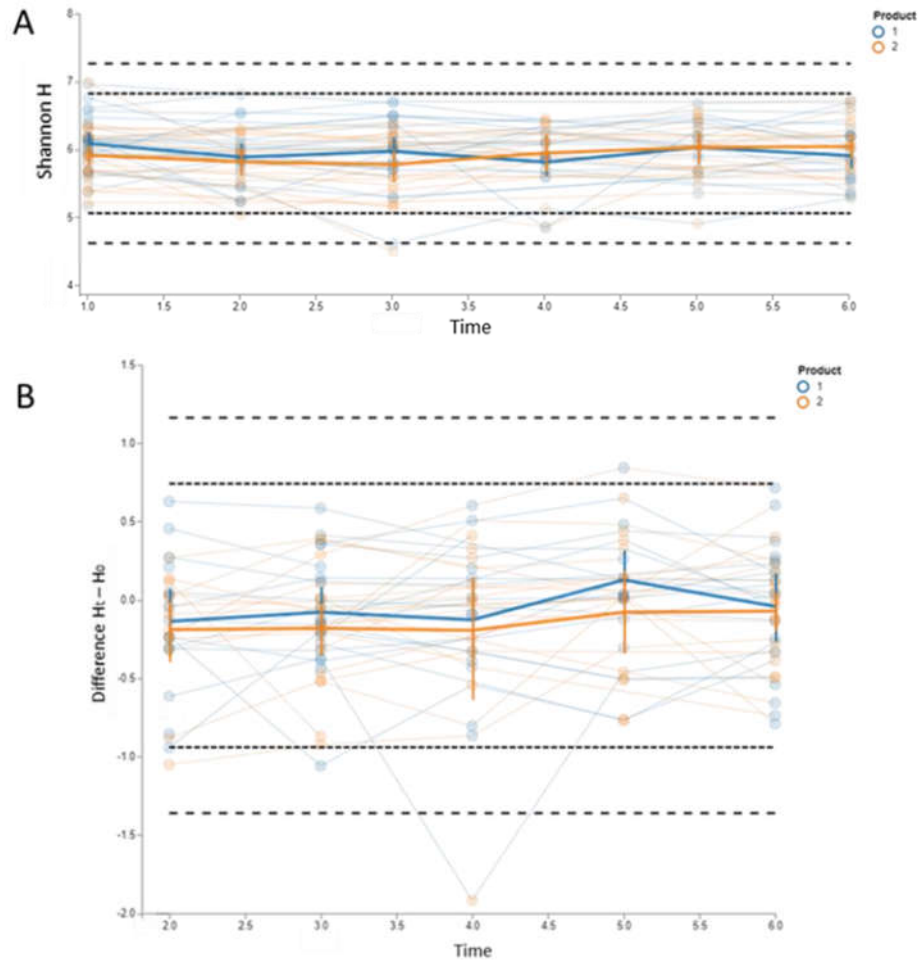


Figura 6. Diversidad alfa. La figura representa la diversidad alfa medida según el índice de Shannon en todo el estudio. El grosor de las líneas con barras de error representan las medias $\pm$ desviación estándar de ambos grupos (Grupo 1: líneas azules; grupo 2: líneas naranjas). Las líneas discontinuas representan las medias $\pm$ 2 DE y medias $\pm$ 3DE. El grupo 1 comenzó la intervención recibiendo el placebo (t1, t2 y t3) y posteriormente se cruzó para recibir la cepa probiótica (t4, t5 y t6). El grupo 2 comenzó la intervención recibiendo la cepa probiótica (t1, t2 y t3) y después recibió el placebo (t4, t5 y t6). **Panel A:** tendencia temporal del índice de Shannon (H). **Panel B:** tendencia temporal del índice de Shannon (H) entre tratamiento y línea de base (delta) (Ht-Ho).

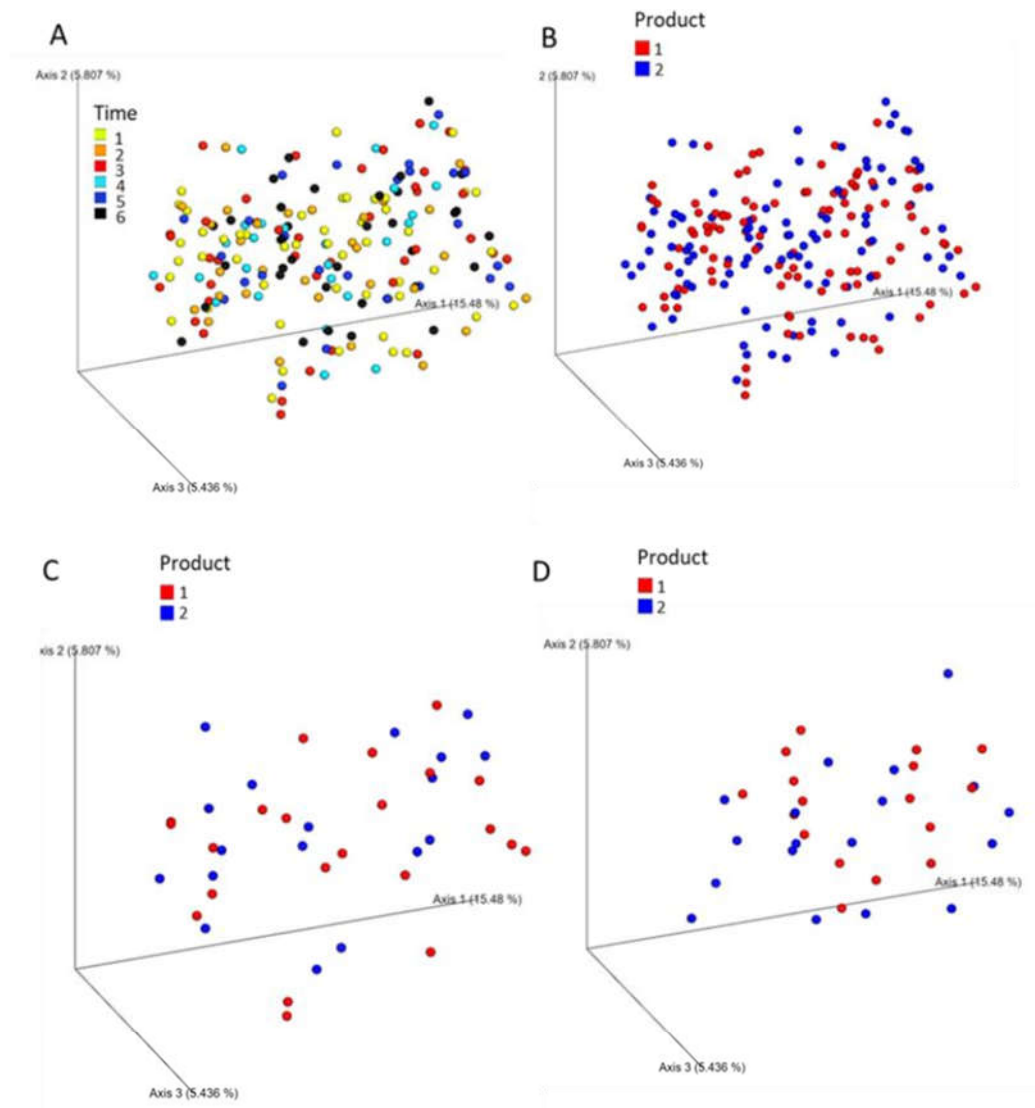


Figura 7. Diversidad beta. Análisis de coordenadas principales (PCoA). Análisis de Unifrac no ponderado y distancias estimadas entre muestras. El diagrama de dispersión tridimensional mostró las distancias de comunidades microbianas entre los participantes por tiempo (primera intervención t1, t2 y t3; segunda intervención t4, t5 y t6) (A), por tratamiento (B), y las distancias entre pacientes al final de la primera intervención (t3) (C) y al final de la segunda intervención (t6) (D).

Sin embargo, al analizar la proporción relativa de taxones específicos, en concreto, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Tenericutes* y *Lentisphaerae*, se observó un aumento en la proporción relativa del filo *Verrucomicrobia* en los participantes que consumieron la cepa probiótica (Figura 8A). Los mismos resultados se encontraron en el género *Akkermansia* (Figura 8B).

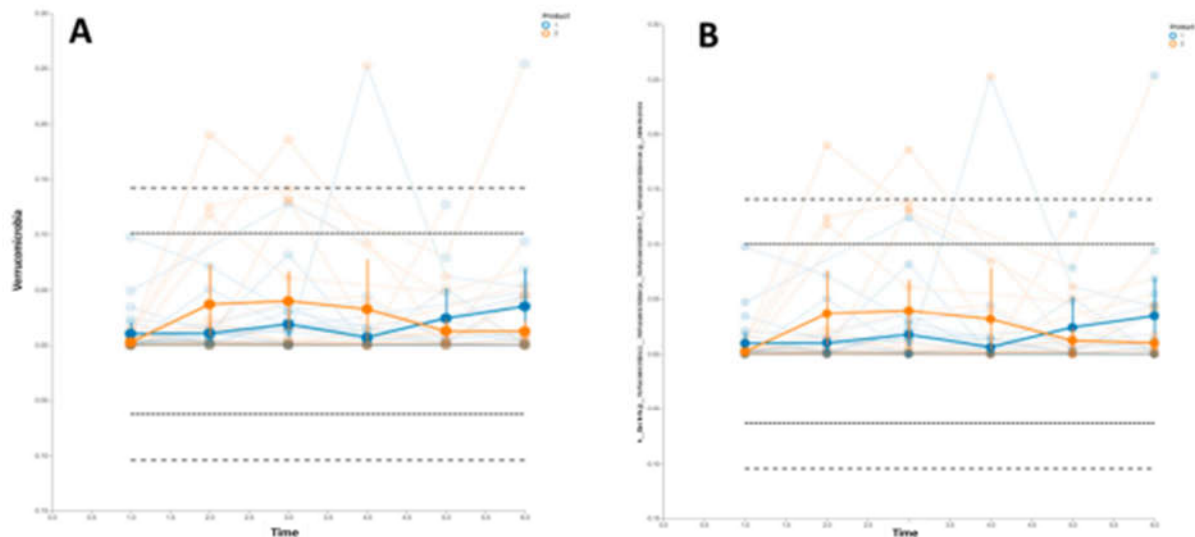
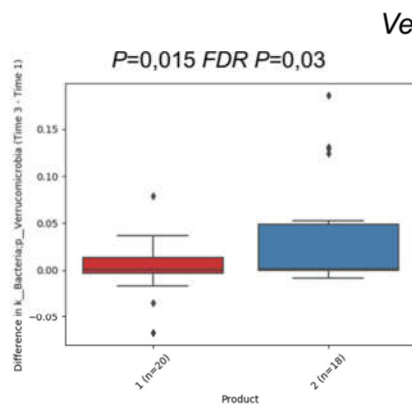


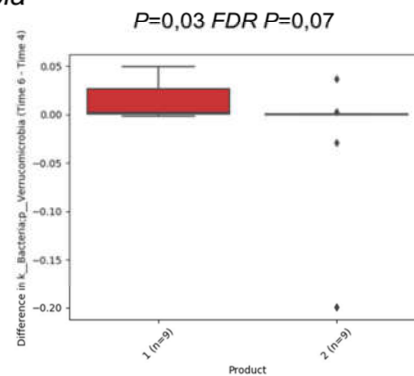
Figura 8. Tendencia de la proporción relativa del filo *Verrucomicrobia* y el género *Akkermansia*. Las líneas gruesas representan las medias de ambos grupos (Grupo 1: líneas azules; grupo 2: líneas naranjas). Las líneas discontinuas representan las medias $\pm$ 2 y 3 desviaciones estándar. El grupo 1 comenzó la intervención recibiendo el placebo (t1, t2 y t3) y posteriormente se cambió para recibir la cepa probiótica (t4, t5 y t6). El grupo 2 comenzó la intervención recibiendo la cepa probiótica (t1, t2 y t3) y después se cambió para recibir el placebo (t4, t5 y t6). **Panel A:** tendencia temporal del filo *Verrucomicrobia*; **Panel B:** tendencia temporal del género *Akkermansia*.

Durante la primera intervención (t1, t2 y t3) se observó un aumento significativo en los incrementos en el filo *Verrucomicrobia* (t3 – t1) debido al tratamiento (probiótico *versus* placebo). Sin embargo, durante la intervención cruzada, no se encontró un aumento significativo en el incremento (t6 – t4) del filo *Verrucomicrobia*, aunque se observa una tendencia (FDR $p = 0,07$) (Figura 9).

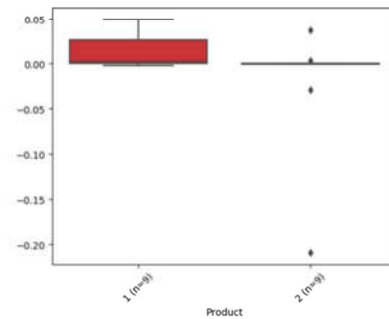
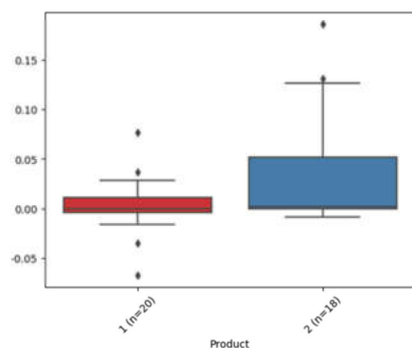
A



B



Akkermansia



C

Primera intervención			
Grupo	W (prueba de rango con signo de Wilcoxon)	p	p-FDR
1 (Placebo)	58,5	0,62	0,62
2 (<i>L.reuteri</i> V3401)	17,5	0,02	0,03
Segunda intervención			
Grupo	W (prueba de rango con signo de Wilcoxon)	p	p-FDR
1 (<i>L.reuteri</i> V3401)	3	0,04	0,07
2 (Placebo)	9,5	0,83	0,83

Figura 9. Abundancia relativa de los valores delta del filo *Verrucomicrobia*. Las gráficas de cuadros indican la abundancia relativa del filo *Verrucomicrobia* entre el punto final y el inicio de cada intervención [t3-t1 (**panel A**) y t6-t4 (**panel B**)] debido al tratamiento, y el número de pacientes (n) de cada grupo y tratamiento. El Panel A muestra datos para la primera parte de este estudio de intervención (Primera intervención, 1: placebo; 2: *L. reuteri* V3401), mientras que el Panel B muestra datos de la intervención después del cruce (Segunda intervención, 1: *L. reuteri* V3401; 2: placebo). El **panel C** describe los valores de prueba de rango con signo de Wilcoxon y los niveles significativos por medio de los valores p y FDR.

6. DISCUSIÓN

El estudio PROSIR es el primer ensayo clínico aleatorizado, cruzado en humanos que evalúa si la cepa *L. reuteri* V3401 es capaz de mejorar los componentes de SM en humanos cuando se agrega a un estilo de vida saludable.

El hecho de no encontrar diferencias significativas en los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos, en concreto aquellos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico y la presión arterial, puede deberse al hecho de que todos los participantes incluidos en el estudio perdieron peso y mejoró su estado metabólico como resultado del asesoramiento para seguir un estilo de vida saludable que incluía dieta y actividad física. Sin embargo, encontramos una disminución en los niveles séricos de IL-6 y sVCAM por efecto del tratamiento. Otros estudios han demostrado que el consumo de cepas probióticas tiene efectos positivos en la reducción de algunos de los componentes que definen el SM y de los marcadores inflamatorios. Así, el consumo de *Lactobacillus casei* Shirota redujo los niveles séricos de sVCAM-1 en individuos que sufren de SM, aunque no se vio afectado el IMC, los niveles de glucemia ni la sensibilidad a la insulina (Tripolt et al. 2013). Del mismo modo, el consumo de leche fermentada enriquecida con *Bifidobacterium lactis* HN019 resultó en una reducción en el IMC, una mejora en el perfil lipídico y una disminución significativa en citoquinas proinflamatorias (TNF e IL-6) (Bernini et al. 2016). Recientemente, en un estudio que incluía a 84 mujeres postmenopáusicas con SM, se encontraron diferencias significativas en glucemia, resistencia a la insulina, TNF- α y trombomodulina. Asimismo, el consumo de *L. acidophilus* La5 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 frente a placebo en adultos con SM durante ocho semanas, resultó en una disminución de la glucemia y de niveles séricos de sVCAM.

La inflamación sistémica de bajo grado tiene un papel importante en el desarrollo de SM. En este sentido, la IL-6 es una citoquina que se ha asociado con la resistencia a la insulina. Específicamente, IL-6 es capaz de inducir resistencia a la insulina en el hígado y en los adipocitos a través de la reducción de la fosforilación del receptor de insulina (IRS), o por inhibición de la transcripción del IRS (Jaganathan et al. 2018, Weigert et al. 2006). Además, moléculas como sVCAM-1, relacionada con los procesos endoteliales, son necesarias para el desarrollo normal y la función del corazón y vasos sanguíneos, y se han relacionado con el desarrollo de ECV (Glowinska et al. 2005). En población española adulta, la alteración del metabolismo de la glucosa se ha relacionado con mayores niveles de sVCAM-1 (Guzmán-Guzmán et al. 2016).

Con respecto a la microbiota intestinal, en los últimos años, ha quedado claro que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de SM. Se ha descrito que grupos bacterianos específicos están involucrados en la obesidad y las enfermedades metabólicas relacionadas. Entre estas bacterias, *Akkermansia muciniphila*, el único género del filo *Verrucomicrobia* presente en el intestino (De Vos et al. 2017), se ha propuesto como contribuyente al mantenimiento de la salud intestinal y la homeostasis de la glucosa (Dao et al. 2016). La administración de *A. muciniphila* a ratones obesos inducidos por la dieta mejoró su endotoxemia metabólica, inflamación del tejido adiposo y resistencia a la insulina (Everard et al. 2013). En nuestro estudio, se observó un aumento en las proporciones relativas de *A. muciniphila* por efecto del tratamiento, aunque no se observaron diferencias a nivel de concentración de LPS y LBP en el suero de los participantes. Tampoco se encontró ninguna correlación significativa entre las proporciones de *Verrucomicrobia* y el resto de biomarcadores inflamatorios. Esto es consistente en ambos períodos de intervención, aunque en el caso del microbioma gastrointestinal, los resultados solo mostraron una tendencia en la segunda intervención, probablemente debido al número de abandonos que tuvimos, lo cual es habitual en grandes estudios de intervención clínica.

La mayoría de los artículos describen que la adición de probióticos al tratamiento de pacientes con SM podría ofrecer una ventaja discreta añadidos al tratamiento médico en términos de mejora de algunas, pero no todas, los componentes del SM. Aunque, de acuerdo a nuestros resultados, no podemos concluir que los probióticos ejercen efectos beneficiosos sobre los componentes del SM, estos podrían tener algunos efectos positivos en la inflamación, aunque estos efectos son marginales en comparación con el tratamiento farmacológico y las medidas higiénico-dietéticas.

Es importante destacar la edad de los sujetos que participaron en nuestro estudio. Nuestros participantes fueron más jóvenes comparados con otros ensayos publicados previamente (Barreto et al. 2014, Stadlbauer et al. 2015, Bernini et al. 2016) y aun así observamos algunos efectos beneficiosos del consumo de la cepa probiótica en esta fase de pre-tratamiento de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

1. En individuos con síndrome metabólico, el consumo de la cepa probiótica *L. reuteri* V3401 durante 12 semanas reduce significativamente los biomarcadores inflamatorios IL-6 y sVCAM comparado con el consumo del correspondiente placebo.
2. En individuos con síndrome metabólico, el consumo de la cepa probiótica *L. reuteri* V3401 durante 12 semanas modifica la microbiota gastrointestinal con aumento de la proporción del filo *Verrucomicrobia*, en particular de la especie *Akkermansia muciniphila* en sujetos con SM comparado con el consumo del correspondiente placebo.
3. En individuos con síndrome metabólico, el consumo de la cepa probiótica *L. reuteri* V3401 no modifica los parámetros antropométricos, el metabolismo glucídico, el metabolismo lipídico, la hipertensión arterial ni la esteatosis hepática comparado con el consumo del correspondiente placebo.

7.1. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En individuos con síndrome metabólico, la administración de la cepa probiótica *L. reuteri* V3401 durante 12 semanas, añadida a medidas higiénico-dietéticas, ejerce efectos beneficiosos sobre algunos parámetros inflamatorios y composición de la microbiota intestinal. En particular, estos efectos pueden estar mediados por una mejora de la disbiosis y una disminución del estado proinflamatorio, ambas características del síndrome metabólico. Sin embargo, se necesitan más estudios bien diseñados, en animales y estudios clínicos, con períodos de intervención más largos, para confirmar estos resultados y dilucidar los mecanismos de acción subyacentes.

8. BIBLIOGRAFÍA

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020 Jan;43(Suppl 1):S14-S31.

American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020 Jan;43(Suppl 1):S66-S76.

Arteaga F, Ferrer A. Dealing with missing data in MSPC: several methods, different interpretations, some examples. *J. Chemometrics*. 2002; 16: 408-418.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 2004;101(44):15718–23.

Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(3):979–84.

Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemometrics*. 2003; 17: 166-173.

Barreto FM, Colado Simão AN, Morimoto HK, Batisti Lozovoy MA, Dichi I, Helena da Silva Miglioranza L. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2014 Jul-Aug;30(7-8):939-42.

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.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(2):160–74.

Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *Peer J. Prepr.* 2018, 6, e27295v2.

Buysschaert M, Bergman M. Definition of prediabetes. *Med Clin North Am.* 2011 Mar;95(2):289-97, vii.

Calixto García F, Ana D, Porto LR, Mayra D, León S, Valdés LLM. Síndrome metabólico. *Rev Cuba Endocrinol.* 2002;13(3):238–52.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761–72.

Cani PD. Microbiota and metabolites in metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Feb;15(2):69-70.

Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. In: *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 1191–212.

Cuevas-Sierra A, Ramos-López O, Riezu-Boj JJ, Milagro FI, Martínez JA. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv Nutr.* 2019 Jan 1;10(suppl_1):S17-S30.

Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L; MICRO-Obes Consortium, Dumas ME, Rizkalla SW, Doré J, Cani PD, Clément K. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 2016 Mar;65(3):426-36.

Das B, Nair GB. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *J Biosci.* 2019 Oct;44(5). pii: 117.

de Groot PF, Frissen MN, de Clercq NC, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*. 2017;8(3):253–67.

Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1469-76.

de Vos WM. Microbe Profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology*. 2017 May;163(5):646-648.

Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 28;110(22):9066-71.

FAO/WHO Expert Consultation. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

Festa A, D'Agostino R, Tracy RP, Haffner SM, Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1131–7.

Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism*. 2005 Aug;54(8):1020-6.

Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998;39(3):237–8.

Guzmán-Guzmán IP, Zaragoza-García O, Vences-Velázquez A, Castro-Alarcón N, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I. [Circulating levels of MCP-1, VEGF-A, sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin and sVE-cadherin: Relationship with components of metabolic syndrome in young population]. *Med Clin (Barc)*. 2016 Nov 18;147(10):427-434.

Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res*. NIH Public Access; 14 2015;116(6):991–1006.

Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2017;376(3):254–66.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14.

Jaganathan R, Ravindran R, Dhanasekaran S. Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Can J Diabetes*. 2018 Aug;42(4):446-456.e1.

Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S, Yu M, Xu J, et al. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*. Elsevier Inc.; 2017;171(7):1481–93.

Lassenius MI, Pietiläinen KH, Kaartinen K, Pussinen PJ, Syrjänen J, Forsblom C, et al. Bacterial Endotoxin Activity in Human Serum Is Associated With Dyslipidemia, Insulin Resistance, Obesity, and Chronic Inflammation. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1809–15.

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):541-6.

Louis-Jean S, Martirosyan D. Nutritionally Attenuating the Human Gut Microbiome To Prevent and Manage Metabolic Syndrome. *J Agric Food Chem*. 2019 Nov 20;67(46):12675-12684.

Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. *MBio* 2014;5(4):e01438–14.

Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369–79.

Mardia KV, Kent JT, Bibby, JM. Multivariate analysis. London: Academic Press, 1979. Print.

Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282–6.

Miglioranza Scavuzzi B, Miglioranza LH da S, Henrique FC, Pitelli Paroschi T, Lozovoy MAB, Simão ANC, et al. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(8):1127–38.

Molinaro A, Wahlström A, Marschall HU. Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends Endocrinol Metab*. Elsevier Ltd; 2018;29(1):31–41.

O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006 Jul;7(7):688-93.

Org E, Blum Y, Kasela S, Mehrabian M, Kuusisto J, Kangas AJ, et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol*. 2017;18(1):70.

Özkul C, Yalınay M, Karakan T. Islamic fasting leads to an increased abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides fragilis* group: A preliminary study on intermittent fasting. *Turk J Gastroenterol*. 2019 Dec;30(12):1030-1035.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327–34.

Pimentel CFMG, Lai M. Nutrition Interventions for Chronic Liver Diseases and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Med Clin North Am*. Elsevier Inc; 2016;100(6):1303–27.

Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients* 2018;10(1):42

Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr*. 2019 Jan 1;10(suppl_1):S49-S66.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55–60.

Rastelli M, Cani PD, Knauf C. The Gut Microbiome Influences Host Endocrine Functions. *Endocr Rev*. 2019 Oct 1;40(5):1271-1284.

Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. SAGE publications Sage UK: London, England; 2017;11(8):215–25.

Ruotolo G, Howard B V. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2002;4(6):494–500.

Ryan A, Heath S, Cook P. Managing dyslipidaemia for the primary prevention of cardiovascular disease. *Bmj*. 2018;946:k946.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol*. 2016;14(8):e1002533.

Smilde AK, Jansen JJ, Hoefsloot HC, Lamers RJ, van der Greef J, Timmerman ME. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics*. 2005 Jul 1;21(13):3043-8.

Suárez JE. [Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics]. *Nutr Hosp*. 2015;31 Suppl 1:3–9.

Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, et al. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care*. 2010;33(9):1925–32.

Stadlbauer V, Leber B, Lemesch S, Trajanoski S, Bashir M, Horvath A, et al. *Lactobacillus casei* Shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: A randomized pilot study. *PLoS One*. 2015;10(10):1–14.

Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, Wu Y, Hazen SL. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Nov 4;64(18):1908-14.

Tang WHW, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatsuma-Boyle B, et al. Gut Microbiota Dependent Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2015;116(3):448–55.

Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Gil Á, Gómez-Llorente C. Effects of Probiotics on Metabolic Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients* 2020 Jan 1; 12(1). pii: E124.

Tripolt NJ, Leber B, Triebel A, Köfeler H, Stadlbauer V, Sourij H. Effect of *Lactobacillus casei* Shirota supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in patients with metabolic syndrome: An open-label, randomized study. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):141–4.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027–131.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. 2007;449(7164):804–10.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480–4.

Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am*. Elsevier Inc; 2018;102(1):13–33.

Vich Vila A, Collij V, Sanna S, Sinha T, Imhann F, Bourgonje AR, Mujagic Z, Jonkers DMAE, Masclee AAM, Fu J, Kurilshikov A, Wijmenga C, Zhernakova A, Weersma RK. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nat Commun*. 2020 Jan 17;11(1):362.

Weigert C, Hennige AM, Lehmann R, Brodbeck K, Baumgartner F, Schaüble M, Häring HU, Schleicher ED. Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7060-7.

Wellek S, Blettner M. On the proper use of the crossover design in clinical trials: part 18 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Apr;109(15):276-81.

WHO | NCD mortality and morbidity. WHO [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2020 Jan 07]; http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8):e71108.

Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018 Mar 9;359(6380):1151-1156.

Zhou JC, Zhang XW. Akkermansia muciniphila: a promising target for the therapy of metabolic syndrome and related diseases. Chin J Nat Med. 2019 Nov;17(11):835-841.

ANEXO I



Review

Effects of Probiotics on Metabolic Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials

Carmen Tenorio-Jiménez ^{1,*}, María José Martínez-Ramírez ^{2,3}, Ángel Gil ^{4,5,6,7} and Carolina Gómez-Llrente ^{4,5,6,7,*}

¹ Endocrinology and Nutrition Clinical Management Unit, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain

² Endocrinology and Nutrition Clinical Management Unit, University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain; mjmartin@ujaen.com

³ Department of Health Sciences, School of Health Sciences, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain; agil@ugr.es

⁵ Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Granada, Spain

⁶ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA, 18012 Granada, Spain

⁷ CIBEROBN (CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: carmentenoriojimenez@hotmail.com (C.T.-J.); gomezll@ugr.es (C.G.-L.); Tel.: +34-958-020-488 (C.T.-J.); +34-958-241-000 (ext. 40092) (C.G.-L.)

Received: 25 November 2019; Accepted: 27 December 2019; Published: 1 January 2020



Abstract: The aim of this systematic review is to evaluate whether the use of probiotics has any effect on the components of metabolic syndrome (MetS) before patients develop type 2 diabetes. A qualitative systematic review, following the Cochrane methodology, and a comprehensive literature search of randomized controlled trials (RCTs) were conducted in PubMed and Scopus from inception until 4 July 2019. According to our inclusion criteria, nine clinical studies were finally analyzed, corresponding to six RCTs. Probiotics intake in patients with MetS resulted in improvements in body mass index, blood pressure, glucose metabolism, and lipid profile in some studies. Regarding inflammatory biomarkers, probiotics also positively affected the soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), and thrombomodulin. Despite the diversity of the published studies, the intake of probiotics for patients with MetS may offer a discrete improvement in some of the clinical characteristics of the MetS and a decrease in inflammatory biomarkers. Nevertheless, these beneficial effects seem to be marginal compared to drug therapy and a healthy lifestyle and clinically non-relevant.

Keywords: metabolic syndrome; gastrointestinal microbiome; probiotics; obesity

1. Introduction

Obesity is increasing worldwide and is associated with the development of metabolic syndrome (MetS), which is a cluster of cardio-metabolic risk factors and comorbidities conveying high risk of both cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes [1]. MetS is characterized by increased white adipose tissue and insulin resistance, which leads to an expanded risk of CVD [2]. According to the International Diabetes Federation (IDF), MetS is defined by the presence of central obesity plus any two of the following four factors: Raised triacylglycerols (>150 mg/dL) or specific treatment for this lipid abnormality; reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) (<40 mg/dL in males, <50 mg/dL in females) or specific treatment for this lipid abnormality; raised blood pressure (BP) (systolic BP $>$

130 mm Hg or diastolic BP > 85 mm Hg) or specific treatment for previously diagnosed hypertension; raised fasting plasma glucose (FPG > 100 mg/dL) or prediabetes [3].

In recent years, it has become apparent that the alteration of the gastrointestinal microbiota composition can contribute to the development of insulin resistance associated with obesity [4–6]. The gastrointestinal microbiota constitutes the set of microorganisms that reside in the gastrointestinal tract. The vast majority of microbes that exist in the human gastrointestinal tract live in the colon. More than 90% of all bacterial phylogenetic types belong to only two of the 70 divisions known (phyla) in the bacterial domain: Bacteroidetes and Firmicutes [7].

In this regard, a decreased ratio of Bacteroidetes/Firmicutes has been described in obese compared to lean subjects [8]. However, there is a lack of consistency among studies. It has been recently hypothesized that low microbial gene richness is a good marker for MetS [9]. Also, an aberrant gut microbiota can promote subacute systemic inflammation, resistance to insulin, and increased risk of CVD, due to mechanisms' exposure to bacterial products, namely bacterial lipopolysaccharide (LPS) [10].

Furthermore, it has been proposed that probiotic intake may ameliorate some of the clinical components of MetS [11]. The term probiotic is currently used to describe bacteria associated with beneficial effects for humans and animals [FAO/WHO Expert Consultation 2001]. The most accepted definition of probiotics is "live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confer a health effect on the host" [12]. However, discrepant data regarding the health benefits of probiotics on metabolic diseases have been described. Some of the studies have found a beneficial effect in some of the components of MetS (BP and lipid profile), whereas contradictory results have been described on their effect on BMI in adult population [13]. These differences can be partially explained because of different study designs and the use of different probiotic strains, dose, and administration form.

For this reason, and to summarize the current status of the available evidence, our group has performed a systematic review of randomized controlled trials (RCTs) in MetS. This review aimed to answer the question: "Does the use of probiotics have any effect on the components of MetS as defined by the IDF before the development of type 2 diabetes?"

2. Materials and Methods

2.1. Search Strategy

We performed a qualitative systematic review of RCTs, published in English, conducted in adults with a diagnosis of MetS according to the IDF criteria. Pubmed (US National Library of Medicine National Institutes of Health), and Scopus databases and the Cochrane Collaboration were used for the literature search. The last day of publication included in this review was 4 July 2019. This literature review has been registered at the PROSPERO (International prospective register of systematic reviews) website on 8 September 2019, with the following record CRD42019142042. Available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42019142042.

For the Pubmed database, we used the following search equation: ("Obesity" [All fields] OR "overweight" [All fields] OR "Metabolic Syndrome" [All fields] OR "Abdominal obesity metabolic syndrome" [Supplementary Concept]) AND "Probiotics" [All fields]. As additional filters, we used Humans, Adults (+19 years old), and Randomized Controlled Trials published in English.

For the Scopus database, we identified the records by applying the following formula: TITLE-ABS-KEY (("Obesity" OR "overweight" OR "Metabolic Syndrome" OR "Abdominal Obesity metabolic syndrome" AND "probiotics")) AND ((clinical AND study)) AND (("Single-Blind Method" OR "Cross-Over Studies" OR "Placebos" OR "multicenter study" OR "double blind procedure" OR "single blind procedure" OR "crossover procedure" OR "clinical trial" OR "controlled study" OR "randomization" OR "placebo")) AND LIMIT-TO (SRCTYPE, "j") AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE, "English")).

2.2. Data Handling, Analysis, Extraction, and Selection Criteria

Articles were selected based on the following inclusion criteria: (i) Intervention studies with probiotics compared to placebo with an RCT design, (ii) intervention studies in adults (age range 18–65) with a diagnosis of MetS according to the IDF criteria. Exclusion criteria were interventions with (i) synbiotics, (ii) prebiotics, (iii) without a proper placebo group, (iv) non-RCT design, (v) performed in children and adolescents, and (vi) articles focusing on people with type 2 diabetes, or pregnant and breastfeeding women. We decided to exclude individuals with type 2 diabetes since many of the specific treatments may have an effect on anthropometric parameters and cardiovascular risk, which are the primary outcomes of our review [14].

The selection was performed by two authors (C.T.-J. and C.G.-L.), who worked independently based on PICO criteria (population, intervention, comparison, outcome) represented in Table 1. In case of discrepancies, a third independent reviewer (A.G.) was consulted for the final decision. Figure 1 represents the procedure that we used for the literature search. Articles were excluded based on the aforementioned exclusion criteria.

Table 1. PICO (population, intervention, comparison, outcome) criteria for inclusion of studies.

Parameter	Inclusion Criteria
Population	Adults (18–65 years old) with Metabolic Syndrome (MetS)
Intervention	Probiotic strains
Comparison	Probiotic strains vs. placebo
Outcome	Improvement on clinical components of the MetS
Setting	Randomized Clinical Trials

The primary outcomes were changes in any of the clinical parameters included in the definition of the MetS, which included BMI, waist circumference, glucose/HOMA index/insulin/glycated hemoglobin, BP, and lipid profile. Additional outcomes were changes in inflammatory parameters, gastrointestinal microbiota composition, and any related indirect measurement of the main components of the MetS and its relation to CVD.

2.3. Risk of Bias (Quality) Assessment

C.T.-J. and C.G.-L. independently assessed the risk of bias of the selected documents using the Cochrane collaboration's methodology. In case of discrepancies, a third reviewer was involved in this evaluation (A.G.). Risk of bias was tabulated for each study and was classified as low, high, and unclear, as described in Chapter 8 of the Cochrane Handbook of Systematic Reviews of Interventions [15], and Figure 2; Figure 3 were generated in RevMan 5.3 (Copenhagen: The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014).

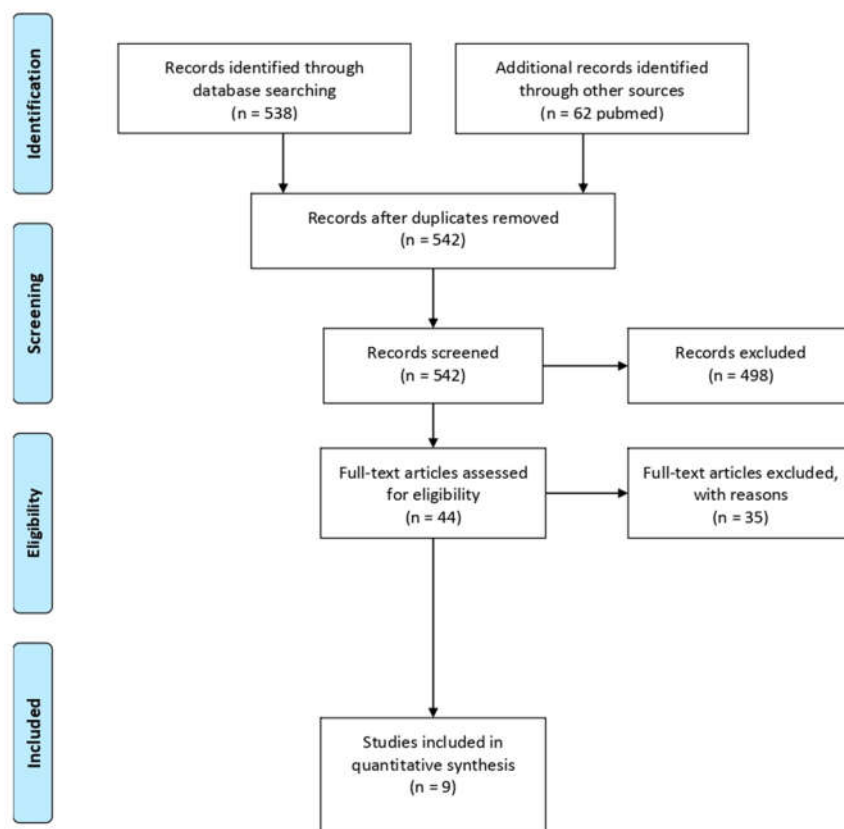


Figure 1. PRISMA flowchart of the literature search process.

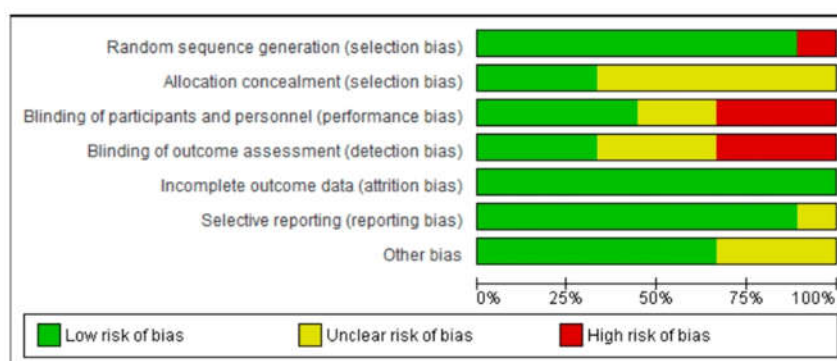


Figure 2. Risk of bias graph: Review authors' judgments about each item presented as percentages across all included studies.

	Random sequence generation (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Barreto et al 2014	●	?	?	?	●	●	●
Bernini et al 2016	●	?	●	?	●	●	●
Leber et al 2012	●	?	●	●	●	●	?
Rezazadeh et al 2019	●	?	?	?	●	?	●
Sharafedinov et al 2013	●	●	●	●	●	●	●
Stadlbauer et al 2015	●	?	●	●	●	●	?
Szulinska et al 2018	●	●	●	●	●	●	●
Szulinska et al 2018 (b)	●	●	●	●	●	●	●
Tripolt et al 2013	●	?	●	●	●	●	?

Figure 3. Risk of bias summary: Review authors' judgments about each risk of bias item for each included study.

2.4. Strategy for Data Synthesis

We provided a narrative synthesis of the main results in the selected trials, organized by specific clinical, biochemical, and gastrointestinal parameters. As a second level, we organized results by the type of probiotic strain.

3. Results

We found nine clinical studies in agreement with our inclusion criteria. The studies performed by Leber et al. [16], Tripolt et al. [17], and Stadlbauer et al. [18] accounted for the same clinical trial registration, as did the two studies conducted by Szulinska [19,20]. Six of them were performed in both men and women, whereas three of them were performed in postmenopausal women. The dose used and the duration of the intervention varied from 10^8 cells/mL to 1.5×10^{11} colony forming units (CFU)/g, and from 3 to 12 weeks, respectively. The main results for primary and secondary outcomes, specific strains used, and characteristics of the studies are described in Table 2.

The probiotic strain was chosen in the different articles for their ability to improve gut permeability in rats [16]; their ability to reduce the gram-negative bacteria and increase bifidobacteria [17]; for their moderate anti-oxidative ability and their cholesterol-lowering efficacy in adults [21]; for their ability to lower plasma glucose, insulin, triacylglycerols, and oxidative stress [22]; for their ability to modulate natural killer cell and neutrophil function [18]; for their capacity to improve insulin resistance and

reduce abdominal obesity in type 2 diabetes patients [19,20]; and there was not a stated reason in two studies [23,24].

We found that there was an improvement in some of the clinical components of the MetS in five out of the nine articles analyzed, specifically, BMI, glucose metabolism, and lipid profile [19,21–24]. Only one trial analyzed markers of endothelial function, showing a reduction of arterial stiffness related parameters, with no significant reductions in BP [20]. We also found an improvement in some of the inflammatory biomarkers; in particular, in the soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), uric acid, homocysteine, LPS, and thrombomodulin as an endothelial cell damage marker [17,19,20,22–24]. Conversely, in the clinical trial NCT01182844, the ultrasensitive C-reactive protein (CRP), a well-known inflammatory biomarker, increased [16,17]. Regarding the effect of probiotics on the gastrointestinal microbiota composition, there are few data about it, although with non-specific changes reported [18,21].

Assessment of Risk of Bias

All selected articles were assessed for risk of bias, in agreement with the Cochrane recommendations. Figures 2 and 3 show the distribution of the risk of bias according to each category and domain specified in the Cochrane collaboration tool. Evaluation of the studies showed a low risk of bias in the following categories: Random sequencing generation (89%), incomplete outcome data (100%), and selective reporting (89%). Notwithstanding, allocation concealment category had a high percentage of unclear risk of bias (67%), whereas blinding of outcome assessment showed a 33% of low risk, unclear risk, and a high risk of bias. In the case of blinding of participants and personnel, we also found a 33% of high risk of bias.

The article of Sharafedinov et al. and the two articles of Szulinska et al. were found to have the lowest risk of bias in the reporting of all items. Selection, performance, and detection bias was considered to have an unclear or high risk of bias in five out of the nine articles included. We believe that the authors should properly describe the type of blinding implemented or the impossibility of blinding.

Table 2. Main characteristics of the nine included articles evaluating the effect of probiotics on metabolic syndrome parameters.

Author	n (Sample Size)	Age Range	Probiotic Strain	Period of Intervention (Weeks)	Probiotic Dose	Primary Outcomes	Secondary Outcomes
Leber et al. [16]	28	Control group: 54.5 ± 8.9 Probiotic group: 51.5 ± 11.4	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	12	milk (65 mL bottles × 3/day) 10 ⁹ cells/mL	No changes were found in BMI, BP, waist circumference, triacylglycerols, TC, and fasting glucose levels.	High-sensitive CRP (1.86 mg/L in the probiotic group vs. −1.60 mg/L in the placebo group, $p = 0.016$) and LBP levels (5827 ng/mL in the probiotic group vs. −1510 ng/mL in the placebo group, $p = 0.023$) increased within the probiotic group.
Sharafeddine et al. [21]	40	Control group: 51.7 ± 12.1 Probiotic group: 52 ± 10.9	<i>Lactobacillus plantarum</i> TENSIA	3	cheese (50 g/day) 1.5 × 10 ¹¹ CFU/g	BMI was significantly reduced in the probiotic group. (BMI variation in probiotic group: −2 vs. −1.6 kg/m ² in the placebo group, $p = 0.031$).	A positive association was detected between TENSIA colonization and the extent of change of morning diastolic BP ($r = 0.617$, $p = 0.0248$).
Trippett et al. [17]	28	Control group: 55 ± 9 Probiotic group: 51 ± 11	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	12	milk (65 mL bottles × 3/day) 10 ⁹ cells/mL	No changes were found in BMI, fasting plasma glucose levels, and HOMA-IR index.	Probiotic supplementation resulted in a significant reduction in sVCAM-1 level (−195 ng/mL in the probiotic group vs. 30 ng/mL in the placebo group, $p = 0.008$) and a significant increase in high-sensitive CRP level (1.86 mg/L in the probiotic group vs. −1.60 mg/L in the placebo group, $p = 0.002$).
Barreto et al. [22]	24	Control group: 63 ± 7.6 Probiotic group: 62 ± 4.35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	12	milk (80 mL bottles × 3/day) 10 ⁹ CFU/g	Glucose levels showed a significant reduction in the FM group compared with the NFM group. (Glucose variation in FM: −10.5 vs. −3 mg/dL in NFM group, $p = 0.037$).	Homocysteine levels showed a significant reduction in the FM group compared with the NFM group ($p = 0.019$).
Stadlbauer et al. [18]	28	Control group: 55 ± 9 Probiotic group: 51 ± 11	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	12	milk (65 mL bottles × 3/day) 10 ⁹ cells/mL	No changes were found in BMI, BP, waist circumference, triacylglycerols, and TC blood levels.	LS administration was associated with subtle microbiota changes at a genus level (enrichment of <i>Parabacteroides</i>).
Bemini et al. [23]	51	No data	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	6	milk (80 mL bottle × 1/day) 3.4 × 10 ⁸ CFU/mL	Significant differences in BMI variation (Probiotic group: −1.3 vs. −0.3 kg/m ² in control group, $p = 0.017$); TC variation (probiotic group: −15 vs. 6 mg/dL in control group, $p = 0.09$) and LDLc variation (probiotic group: −17.5 vs. −2 mg/dL in control group, $p = 0.08$).	Significant decrease in TNFα and IL-6 ($p < 0.05$) in the probiotic group.
Szulinska et al. [19]	81	Control group: 58.72 ± 7.25 Low dose group: 56.38 ± 6.55 High dose group: 55.16 ± 6.87	<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23, <i>Bifidobacterium lactis</i> W51, <i>Bifidobacterium lactis</i> W52, <i>Lactobacillus acidophilus</i> W37, <i>Lactobacillus brevis</i> W63, <i>Lactobacillus casei</i> W56, <i>Lactobacillus salivarius</i> W24, <i>Lactococcus lactis</i> W19, and <i>Lactococcus lactis</i> W58	12	lyophilisate powder Low dose (2.5 × 10 ⁹ CFU/day) or High dose (1 × 10 ¹⁰ CFU/day)	Significant differences were found in glucose variation (HD vs. placebo: −0.61 mg/dL, $p = 0.0272$; HD vs. LD: −0.72 mg/dL, $p = 0.0043$); Insulin (HD vs. placebo: −0.83 U/L, $p = 0.0002$; HD vs. LD: −0.40 U/L, $p = 0.0155$); and HOMA-IR (HD vs. placebo: −0.90, $p = 0.0005$; HD vs. LD: −0.54 mg/dL, $p = 0.0127$).	Significant differences were found in uric acid (HD vs. placebo: −0.73 mmol/L, $p = 0.0109$; HD vs. LD: −0.92 mmol/L, $p = 0.0016$) and LPS levels (HD vs. placebo: −0.99 ng/mL, $p = 0.001$).

Table 2. Cont.

Author	n (Sample Size)	Age Range	Probiotic Strain	Period of Intervention (Weeks)	Probiotic Dose	Primary Outcomes	Secondary Outcomes
Szulinska et al. [20]	81	Control group: 58.72 ± 7.25 Low dose group: 56.38 ± 6.55 High dose group: 55.16 ± 6.87	<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23, <i>Bifidobacterium lactis</i> W51, <i>Bifidobacterium lactis</i> W52, <i>Lactobacillus acidophilus</i> W37, <i>Lactobacillus brevis</i> W63, <i>Lactobacillus casei</i> W56, <i>Lactobacillus salivarius</i> W24, <i>Lactococcus lactis</i> W19, and <i>Lactococcus lactis</i> W58	12	lyophilisate powder Low dose (2.5 × 10 ⁹ CFU/day) or High dose (1 × 10 ¹⁰ CFU/day)	No changes were found in BMI and BP.	Significant differences were found in the pulse wave analysis systolic pressure (HD vs. placebo: −1 mmHg, $p = 0.0054$; HD vs. LD: −0.91 mmHg, $p = 0.0057$); the pulse wave analysis augmentation index (HD vs. placebo: −0.55, $p = 0.0079$); the pulse wave velocity (HD vs. placebo: −0.82 m/s, $p = 0.0045$; HD vs. LD: −0.55 m/s, $p = 0.0189$); VEGF (HD vs. placebo: −1.09 pg/mL, $p = 0.0001$; HD vs. LD: −1.10 pg/mL, $p = 0.0002$); TNFα (HD vs. placebo: −1.03 pg/mL, $p = 0.0009$; HD vs. LD: −0.68 pg/mL, $p = 0.0471$); and thrombomodulin levels (HD vs. placebo: −0.78 ng/mL, $p = 0.0194$).
Razazadeh et al. [24]	44	Control group: 44.55 ± 5.70 Probiotic group: 44.05 ± 6.60	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	8	yogurt containing 6.45 × 10 ⁹ CFU/g of <i>L. acidophilus</i> and 4.94 × 10 ⁸ CFU/g of <i>B. lactis</i> Bb12	Consumption of probiotic yogurt resulted in a significant reduction in the level of blood glucose (Mean difference: −3.80, $p = 0.01$).	Consumption of probiotic yogurt resulted in a significant reduction in the level of VCAM-1 (Mean difference: −463.39, $p = 0.001$).

Abbreviations: SD: Standard deviation; BMI: Body mass index; BP: Blood pressure; TC: Total cholesterol; CRP: C reactive protein; LBP: Lipopolysaccharide binding protein; CFU: Colony forming units; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1; LDLc: Low-density lipoprotein cholesterol; FM: Fermented milk; NFM: Non-fermented milk; LS: *Lactobacillus casei* Shirota; TNF-α: Tumor necrosis factor α; IL-6: Interleukine-6; HOMA-IR: Homeostasis model assessment-insulin resistance; LPS: Lipopolysaccharide; HD: High dose; LD: Low dose; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

4. Discussion

The main findings of the present review were that some of the selected probiotics are able to discretely improve some of the clinical components of the MetS, as well as some inflammatory biomarkers associated with the syndrome. Although significant, these supposedly positive effects are clinically non-relevant.

Regarding other similar studies, there is a previously published meta-analysis on probiotic foods and supplements interventions, including 18 RCTs with at least one of the criteria included in the definition of MetS [25]. They described a marginal and non-relevant effect on body fat percentage (-0.30%) and on low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels (-0.16 mg/dL). Although we have not performed a meta-analysis, in both cases, an effect on some of the MetS components has been found. However, the validity of the latter meta-analysis for extracting meaningful information about the MetS is more than dubitable, due to the heterogeneity of the studied populations, namely: Pregnant women, children and adolescents, people with type 2 diabetes, high BP, or overweight.

In addition, there has been another published meta-analysis evaluating the effect of probiotics on overweight and obese subjects. The authors reported a decrease in BMI and body weight in the intervention group. Although they found some significant changes, they were clinically irrelevant (-0.6 kg, -0.27 kg/m²) [26].

Similarly, the effects of probiotic supplementation have been also analyzed in a meta-analysis of RCTs in patients with type 2 diabetes mellitus. They found a modest reduction in fasting glucose levels and an improvement in oxidative stress biomarkers [27].

Currently, to the best of our knowledge, there has not been a meta-analysis only in patients with a specific diagnosis of MetS published, excluding people with type 2 diabetes. MetS, as a cluster of anthropometric, clinical and metabolic abnormalities, has had different definitions developed under the auspices of diverse scientific societies and some of the cut-offs of its criteria vary [28]. In the present review, the included studies used the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria [16–18,22,23], obesity accompanied by arterial hypertension [21], and the IDF criteria [19,20,24].

To answer the question “Does the use of probiotics strains have any effect on the components of MetS, as defined by the IDF, before the development of type 2 diabetes?” a meta-analysis could not be performed, due to the design and methodology diversity and the small number of RCTs [29]. As opposed to the meta-analyses conducted in drugs, those conducted in nutritional science are not always the best method for extracting relevant information, due to the heterogeneity of interventions and protocols [29]. Indeed, one important issue that this review highlights is the heterogeneity of the studies, in terms of population, probiotic strain and genus, administered doses, and the period of the interventions.

Regarding the subjects included, some of the studies only recruited women, whereas the rest studied the probiotics in men and women in different proportions. From a clinical point of view, there may be a different cardiovascular risk in women than in men with MetS; however, the clinical implications of this issue are currently unknown [30].

Different strains have been used, and also some of the clinical studies used a mix of different probiotic strains. It is well-known that the probiotic effects are strongly strain-dependent. Type of strain used has mostly been selected due to previous beneficial effects in animals; however, animals' results cannot always be transferred to human studies. Furthermore, the dose range, varying from 10^8 to 10^{11} cells or CFU, and the administration form (cheese, yogurt, and milk or probiotic capsule), can also account for additional differences.

In addition, in three of the studies included, the time of exposure (3–6 weeks) could have not been long enough to demonstrate changes in some of the parameters related to glucose metabolism and insulin-resistance, such as glycated hemoglobin (HbA1c), the main diabetes control marker in clinical practice [31]. This is due to the fact that HbA1c depends on the lifespan of erythrocytes and reflects the glycemic control for the last two to three months [32].

On the other hand, only two of the nine reviewed articles studied the gut microbiota composition (Stadlbauer et al., Leber et al.). Nowadays, there is scientific evidence of the implication of the gastrointestinal microbiota in the development of MetS [4–7]. Therefore, the determination of the gastrointestinal composition should be implemented in RCTs with probiotics. In this sense, metagenomics can provide important insights into the functional ecology microorganisms.

Finally, one important limitation of this study is that we have only located nine articles meeting our criteria, which correspond to just six registered RCTs. However, we feel that our revision provides an updated picture of the available evidence.

5. Conclusions

According to the available data, most of the analyzed articles describe that the addition of probiotics to the treatment of patients with MetS may offer a discrete advantage to the current medical treatment in terms of improvement of some, but not all, of the clinical characteristics of the MetS and related inflammatory biomarkers. Although we cannot conclude that probiotics exert beneficial effects, they may have some positive effects that are marginal compared to drug therapy and a healthy lifestyle, and probably dose- and strain-specific. Also, the duration of the interventions may have not been long enough to prove the decrease in MetS associated complications.

For this reason, there is a need for better RCTs in humans with MetS able to fully elucidate if probiotics can be actually used as a coadjuvant therapy for this pathology. In this sense, we suggest following these recommendations when designing RCTs: (1) A crossover design is a more appropriate approach to determine the health benefits of clinical interventions than a parallel design. (2) RCTs should be designed with a more appropriate estimation of the size and statistical power, duration, type of strain, dose, and mode of delivery. (3) Finally, special caution should be taken in the interpretation of results so as to not confound statistical significance with biological relevance or strength of evidence.

Author Contributions: Conceptualization, Á.G., C.T.-J., M.J.M.-R., and C.G.-L.; methodology, Á.G., C.T.-J., and C.G.-L.; writing—original draft preparation, C.G.-L. and C.T.-J.; review and editing, C.G.-L., C.T.-J., M.J.M.-R., and Á.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This paper will be part of Carmen Tenorio Jimenez's doctorate, which is being completed as part of Programa de Doctorado en Seguridad de los Alimentos at the University of Jaén, Spain. Carolina Gomez-Llorente and Angel Gil are part of the "UGR Plan Propio de Investigación 2016" and the "Excellence actions: Unit of Excellence on Exercise and Health (UCEES), University of Granada".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zimmet, P.; Alberti, K.G.; Stern, N.; Bilu, C.; El-Osta, A.; Einat, H.; Kronfeld-Schor, N. The Circadian Syndrome: Is the Metabolic Syndrome and much more! *J. Intern. Med.* **2019**, *286*, 181–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alberti, K.G.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; Hational Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Alberti, K.G.; Zimmet, P.; Shaw, J. Metabolic syndrome—A new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet. Med.* **2006**, *23*, 469–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bäckhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L.V.; Koh, G.Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15718–15723. [[CrossRef](#)]
5. Bäckhed, F.; Manchester, J.K.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 979–984. [[CrossRef](#)]

6. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1131. [[CrossRef](#)]
7. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Hamady, M.; Fraser-Liggett, C.M.; Knight, R.; Gordon, J.I. The human microbiome project. *Nature* **2007**, *449*, 804–810. [[CrossRef](#)]
8. Turnbaugh, P.J.; Hamady, M.; Yatsunenko, T.; Cantarel, B.L.; Duncan, A.; Ley, R.E.; Sogin, M.L.; Jones, W.J.; Roe, B.A.; Affourtit, J.P.; et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **2009**, *457*, 480–484. [[CrossRef](#)]
9. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Pridi, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.M.; Kennedy, S.; et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546. [[CrossRef](#)]
10. Plovier, H.; Cani, P.D. Microbial Impact on Host Metabolism: Opportunities for Novel Treatments of Nutritional Disorders? *Microbiol. Spectr.* **2017**, *3*, 131–148. [[CrossRef](#)]
11. Sáez-Lara, M.J.; Robles-Sanchez, C.; Ruiz-Ojeda, F.J.; Plaza-Diaz, J.; Gil, A. Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sanders, M. Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, S58–S61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rondanelli, M.; Faliva, M.A.; Perna, S.; Giacosa, A.; Peroni, G.; Castellazzi, A.M. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut. Microbes* **2017**, *8*, 521–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Adeshirlarijaney, A.; Zou, J.; Tran, H.; Chassaing, B.; Gewirtz, A.T. Amelioration of metabolic syndrome by metformin associates with reduced indices of low-grade inflammation independently of the gut microbiota. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Higgins, J.P.T.; Altman, D.G.; Sterne, J.A.C. Chapter 8. In *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, Version 5.1.0*; Higgins, J.P.T., Green, S., Eds.; The Cochrane Collaboration: London, UK, 2011; Available online: www.cochrane-handbook.org (accessed on 30 September 2019).
16. Leber, B.; Tripolt, N.J.; Blattl, D.; Eder, M.; Wascher, T.C.; Pieber, T.R.; Stauber, R.; Sourij, H.; Oettl, K.; Stadlbauer, V. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: An open label, randomized pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 1110–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tripolt, N.J.; Leber, B.; Blattl, D.; Eder, M.; Wonisch, W.; Scharnagl, H.; Stojakovic, T.; Obermayer-Pietsch, B.; Wascher, T.C.; Pieber, T.R.; et al. Short communication: Effect of supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota on insulin sensitivity, β -cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome—A pilot study. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 89–95. [[CrossRef](#)]
18. Stadlbauer, V.; Leber, B.; Lemesch, S.; Trajanoski, S.; Bashir, M.; Horvath, A.; Tawdrous, M.; Stojakovic, T.; Fauler, G.; Fickert, P.; et al. *Lactobacillus casei* Shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: A randomized pilot study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141399. [[CrossRef](#)]
19. Szulińska, M.; Loniewski, 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*, 773. [[CrossRef](#)]
20. Szulińska, M.; Loniewski, I.; Skrypnik, K.; Sobieska, M.; Korybalska, K.; Suliburska, J.; Bogdański, P. Multispecies Probiotic Supplementation Favorably Affects Vascular Function and Reduces Arterial Stiffness in Obese Postmenopausal Women—A 12-Week Placebo-Controlled and Randomized Clinical Study. *Nutrients* **2018**, *10*, 1672. [[CrossRef](#)]
21. Sharafedinov, K.K.; Plotnikova, O.A.; Alexeeva, R.I.; Sentsova, T.B.; Songisepp, E.; Stsepelova, J.; Smidt, I.; Mikelsaar, M. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients—A randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutr. J.* **2013**, *12*, 138. [[CrossRef](#)]
22. Barreto, F.M.; Colado Simão, A.N.; Morimoto, H.K.; Batisti Lozovoy, M.A.; Dichi, I.; Helena da Silva Miglioranza, L. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition* **2014**, *30*, 939–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Bernini, L.J.; Simão, A.N.; Alfieri, D.F.; Lozovoy, M.A.; Mari, N.L.; de Souza, C.H.; Dichi, I.; Costa, G.N. 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*, 716–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rezazadeh, L.; Gargari, B.P.; Jafarabadi, M.A.; Alipour, B. Effects of probiotic yogurt on glycemic indexes and endothelial dysfunction markers in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* **2019**, *62*, 162–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dong, Y.; Xu, M.; Chen, L.; Bhochhibhoya, A. Probiotic Foods and Supplements Interventions for Metabolic Syndromes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Recent Clinical Trials. *Ann. Nutr. Metab.* **2019**, *74*, 224–241. [[CrossRef](#)]
26. Borgeraas, H.; Johnson, L.K.; Skattebu, J.; Hertel, J.K.; Hjelmestaeth, J. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 219–232. [[CrossRef](#)]
27. Ardeshtarijani, E.; Tabatabaei-Malazy, O.; Mohseni, S.; Qorbani, M.; Larijani, B.; Baradar Jalili, R. Effect of probiotics supplementation on glucose and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized trials. *DARU* **2019**, *27*, 827–837. [[CrossRef](#)]
28. Dabke, K.; Hendrick, G.; Devkota, S. The gut microbiome and metabolic syndrome. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 4050–4057. [[CrossRef](#)]
29. Barnard, N.D.; Willett, W.C.; Ding, E.L. The Misuse of Meta-analysis in Nutrition Research. *JAMA* **2017**, *318*, 1435–1436. [[CrossRef](#)]
30. Rochlani, Y.; Pothineni, N.V.; Mehta, J.L. Metabolic Syndrome: Does It Differ between Women and Men? *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2015**, *29*, 329–338. [[CrossRef](#)]
31. American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* **2019**, *42*, S61–S70. [[CrossRef](#)]
32. Kojić Damjanov, S.; Đerić, M.; Eremić Kojić, N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. *Med. Pregl.* **2014**, *67*, 339–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO II

STUDY PROTOCOL

Open Access



Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation, cardiovascular risk and liver steatosis in obese adults with metabolic syndrome: a randomized clinical trial (PROSIR)

Carmen Tenorio-Jiménez¹, María José Martínez-Ramírez^{1,2}, Mercedes Tercero-Lozano³, Carmen Arraiza-Irigoyen¹, Isabel Del Castillo-Codes³, Josune Olza^{4,5,6,7}, Julio Plaza-Díaz^{4,5,6}, Luis Fontana^{4,5,6}, Jairo H. Migueles⁸, Mónica Olivares⁹, Ángel Gil^{4,5,6,7} and Carolina Gomez-Llrente^{4,5,6,7*} 

Abstract

Background: Obesity is characterized by increased fat mass and is associated with the development of insulin resistance syndrome (IRS), usually known as metabolic syndrome. The alteration of the intestinal microbiota composition has a role in the development of IRS associated with obesity, and probiotics, which are live microorganisms that confer a health benefit to the host, contribute to restore intestinal microbiota homeostasis and lower peripheral tissue insulin resistance. We aim to evaluate the effects of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) V3401 on the composition of intestinal microbiota, markers of insulin resistance and biomarkers of inflammation, cardiovascular risk, and hepatic steatosis in patients with overweight and obesity exhibiting IRS.

Methods/design: We describe a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled, and single-centre trial. Sixty participants (aged 18 to 65 years) diagnosed with IRS will be randomized in a 1:1 ratio to receive either a daily dose of placebo or 5×10^9 colony-forming units of *L. reuteri* V3401. The study will consist of two intervention periods of 12 weeks separated by a washout period of 6 weeks and preceded by another washout period of 2 weeks. The primary outcome will be the change in plasma lipopolysaccharide (LPS) levels at 12 weeks. Secondary outcomes will include anthropometric parameters, lipid profile, glucose metabolism, microbiota composition, hepatic steatosis, and inflammatory and cardiovascular biomarkers. Blood and stool samples will be collected at baseline, at the midpoint (only stool samples) and immediately after each intervention period. Luminex technology will be used to measure interleukins. For statistical analysis, a mixed ANOVA model will be employed to calculate changes in the outcome variables.

(Continued on next page)

* Correspondence: gomezll@ugr.es

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University of Granada, Granada, Spain

²Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Centre of Biomedical Research, University of Granada, Campus de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Discussion: This is the first time that *L. reuteri* V3401 will be evaluated in patients with IRS. Therefore, this study will provide valuable scientific information about the effects of this strain in metabolic syndrome patients.

Trial registration: The trial has been retrospectively registered in ClinicalTrials.gov on the 23rd November 2016 (ID: [NCT02972567](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02972567)), during the recruitment phase.

Keywords: Human adults, Insulin resistance syndrome, *Lactobacillus reuteri* V3401, Non-alcoholic fatty liver disease, Obesity, Probiotics

Trial status

Currently, the trial is ongoing and the analyses of the data and biomarkers continuing.

Background

Obesity is a chronic, low-grade systemic inflammatory disease that is complex and multifactorial, with both genetic and environmental factors involved. This condition and its comorbidities have reached epidemic proportions, both in developed and developing countries [1]. Obesity is associated with the development of insulin resistance syndrome (IRS), commonly referred to as metabolic syndrome. IRS is defined by the presence of impaired glucose metabolism, hypertriglyceridemia, low concentrations of serum high-density lipoprotein (HDL) and other alterations associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD). IRS is a key factor in the development of type 2 diabetes mellitus (DM2), CVD and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [2]. Clinical management of IRS remains a public health challenge. Indeed, current treatment is based on changes in lifestyle through hygienic-dietary measures (diet and exercise) combined with medical therapy, if necessary, to treat the components of IRS separately and not as a whole entity.

In recent years, it has become clear that the alteration of the intestinal microbiota composition can contribute to the development of insulin resistance associated with obesity [3–5]. In this sense, a decreased *Bacteroidetes/Firmicutes* ratio has been described in obese compared to lean individuals [6]. Furthermore, an aberrant intestinal microbiota is able to promote a state of low-grade systemic inflammation, insulin resistance and increased CVD risk through mechanisms that include exposure to bacterial products. In particular, lipopolysaccharide (LPS) produces metabolic endotoxaemia capable of modulating pro-inflammatory cytokines and altering glucose and lipid metabolism in the liver and adipose tissue [7, 8]. In addition, it has been reported that high concentrations of serum LPS-binding protein (LBP) are associated with obesity, IRS and DM2 [9].

Probiotics are live microorganisms that confer a health benefit on the host when administered in adequate

amounts. They can modulate the gut microbiota and the immune system. The strains most frequently used as probiotics belong to the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera [10]. In this regard, our group has reported that the administration of 9×10^9 cfu (colony-forming units)/day of three probiotics strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 and *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035) to healthy subjects during 30 days induced significant colon microbiota modifications [11].

This fact opens the possibility of a new approach in the treatment of IRS, not with drugs but with functional foods containing probiotics [12]. Intervention studies to determine the effect of probiotics on the components of IRS are limited and often contradictory, mainly due to differences in the design of the study protocol and in the selection of the probiotic strain because the effects observed are strain dependent.

In this sense, it has been described that *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) V3401 (CECT 8605) successfully reduces the absorption of cholesterol by intestinal epithelial cells in in vitro and in vivo assays. This cholesterol-absorbing capacity may be induced through an increase in lytic activity specific to *L. reuteri* V3401 [13]. In an animal model, mice fed a hypercholesterolemic diet supplemented with 2×10^9 cfu of *L. reuteri* V3401/day for 57 days exhibited reduced serum cholesterol levels compared to hypercholesterolemic mice that did not receive the probiotic supplement. Moreover, the animals supplemented with the probiotic strain showed glycemic values similar to those of normocholesterolemic mice [13]. These results suggest that this strain might be adequate for the treatment of dyslipidaemia [13]. We therefore hypothesize that *L. reuteri* V3401 may provide a beneficial effect on IRS treatment, and we aim to study *L. reuteri* V3401 effects in a crossover clinical double-blind, randomized, placebo-controlled trial in IRS patients.

Method/design

Aim of the study

The main objective is to evaluate the effects of *L. reuteri* V3401 on the composition of intestinal microbiota,

anthropometric parameters, and biomarkers of insulin resistance (inflammation, cardiovascular risk, and hepatic steatosis) in IRS patients.

***Lactobacillus reuteri* V3401 characteristics**

Lyophilized *L. reuteri* V3401 capsules will be specially prepared for the trial. The capsules will contain 5×10^9 cfu, in agreement with previous data obtained from studies in animals [13]. The placebo will contain maltodextrin and will also be supplied in capsules. Capsules for the probiotic and placebo will be indistinguishable in shape, colour, and organoleptic conditions, and will be provided by Biosearch Life.

Study design

The study is a randomized, double-blind, crossover, controlled, and single-center trial. The trial will be conducted by members of both the Endocrinology and Nutrition Department and the Gastroenterology Department of Complejo Hospitalario de Jaén (Spain). Participants will be instructed to follow a prebiotic- and probiotic-free diet two weeks before the beginning of the intervention and during the study. The study will be performed as shown in Fig. 1. Blood samples, as well as the food and physical activity questionnaire will be analysed by the members of the University of Granada at the University facilities. Microbial DNA isolated from faecal samples will be sequenced in the facilities of the Hospital Universitario San Cecilio (Granada, Spain).

The protocol (PROSIR version 2) will be approved by the local Ethics Committee of Granada and Jaén (CEI-Granada and CEI Jaén with references CEI- Jaén 25,022,016 and CEI-Granada 28,022,016, respectively), and conducted according to the standards given in the Declaration of

Helsinki and the Good Clinical Practice Guidelines [14]. All investigators participating in the trial are appropriately qualified.

The Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) guidelines for this study protocol has been included as an Additional file 1.

Participants, interventions, and outcomes

Inclusion criteria

Individuals aged 18 to 65 years newly-diagnosed with IRS, according to the criteria of the International Diabetes Federation (IDF), and without any previous treatment for the metabolic syndrome, will participate in the study. The prescription of any treatment not allowed during the course of the study, according to exclusion criteria, will be considered a reason for dropping out. Before starting the trial, written informed consent will be provided by all patients.

Exclusion criteria

The use of hypoglycaemic treatment, lipid-lowering medications and treatment with drugs that increase liver enzymes, treatment with specific anti-hypertensives (beta-blockers, angiotensin 2 receptor antagonists, angiotensin-converting enzyme inhibitors) will be considered as an exclusion criteria. Moreover, the exclusion criteria include the presence of kidney disease; diabetes; acute liver injury or severe cirrhosis; immune deficiency conditions; elevated values of C-reactive protein; pregnancy or breastfeeding; history of drug or alcohol abuse; or participation in a study of an investigational medication within the past 30 days.

Recruitment

A total of 60 subjects are expected to be recruited from the Endocrine and Nutrition Clinic at Complejo

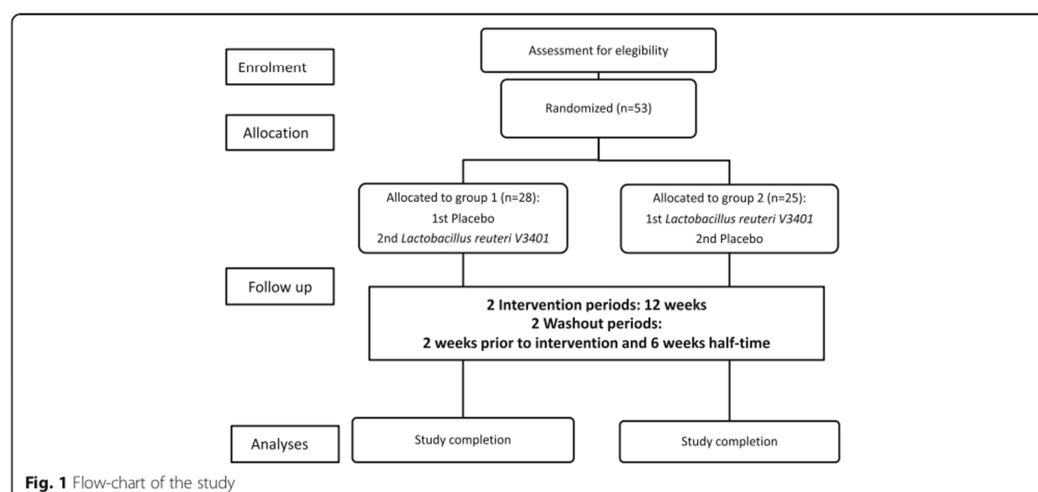


Fig. 1 Flow-chart of the study

Hospitalario de Jaén (Spain) by the physician responsible, through the local newspaper and using advertisement posts at different locations at the hospital facilities.

Randomization, allocation, and blinding

Patients will be randomly allocated in a 1:1 ratio to receive a capsule containing either lyophilized *L. reuteri* V3401 or placebo once daily with food for 12 weeks. A stratified block-randomization method of a software program for sequence generation will be used. After a 6-week washout, participants will crossover to receive the alternative intervention for another 12 weeks. Subjects and investigators will be blinded to the treatment allocation during the course of the intervention. The blind will be broken following consultation with the sponsor.

The capsules will be prepared in special containers with the random number label. Capsules will be delivered at the beginning of each intervention and six weeks later to ensure probiotic viability.

Intervention

We will conduct a standard semi-structured clinical interview with clinical assessment. Subsequently, we will audit the clinical reports to extract relevant information (Additional file 2). In addition, a physical examination, and a complete blood test will be also conducted prior to inclusion in the study. Participants meeting the inclusion criteria will be randomly assigned to the probiotic or placebo group. During the intervention, participants will be asked to ingest a capsule per day with food. Capsules will be administered over two periods of 12 weeks. During the washout period, participants will not receive dietary recommendations. Clinical follow-up visits will be scheduled at the beginning, midpoint, and end of each interventional period. At each visit, anthropometric parameters will be registered, and possible adverse effects will be recorded (Table 1).

The data and samples will be collected in the Complejo Hospitalario de Jaén by qualified personal, and will be codified according to the biobank of the Public Health System of Andalusia (BSSPA) guidelines. All samples will be managed and processed in accordance with BSSPA protocols. All samples will be centralized at the BSSPA facilities.

Dietary and physical activity control

Participants will be provided with a list of local foods to avoid due to their potential probiotic or prebiotic content. Subjects will be asked to complete a three-day dietary record at the beginning, midpoint, and end of each intervention period. Energy and dietary intakes will be assessed from the 3-day records using the EvalFINUT software (<http://www.finut.org/evalfinut/>). Additionally, subjects will complete the Food Frequency Questionnaire (FFQ)

at the beginning of each intervention period. Participants will receive nutritional counselling on a healthy Mediterranean diet providing approximately 25 kcal/kg/day to achieve and maintain 7% loss of initial body weight and increase moderate-intensity physical activity (such as brisk walking) for at least 150 min/week following the guidelines of the American Diabetes Association for the prevention or delay of DM2 [15]. Likewise, physical activity will be monitored through the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) at the beginning, midpoint, and end of each intervention period. In the following visits, an intensive lifestyle intervention programme will be carried out to reinforce the behaviour.

Outcome measures

Clinical and anthropometric parameters (weight, height, waist circumference and blood pressure) will be recorded. A hepatic ultrasound (US) test will also be performed at the beginning of the two intervention periods, as well as at the end of the intervention periods. US diagnostic criteria for diagnosis and grading of hepatic steatosis will be used [16]. Smoking habits and anxiolytic and antihistaminic drug intake will also be recorded.

Blood samples will be collected after 12 h of fasting at the beginning and at the end of each intervention period (t0, t12, t18 and t30). Stool samples will also be taken at baseline and at 6, 12, 18, 24, and 30 weeks (t0, t6, t12, t18, t24, and t30, respectively). Serum will be collected by centrifugation of blood samples for the determination of biochemical and inflammation biomarkers. Faecal samples will be collected and kept at -80°C until analysis. All samples will remain frozen at -80°C in the BSSPA Platform.

Primary outcome

The primary outcome will be the change in plasma lipopolysaccharide (LPS) concentration. The determination of LPS concentration and LPS-binding lipoprotein (LBP) will be performed by a simple ELISA (Cloud-Clone Corp., Houston, USA).

Secondary outcomes

Body Mass Index (BMI) and waist circumference will be registered at the beginning, midpoint, and end of each intervention period by qualified staff. Systolic and diastolic blood pressures will be determined three times at 5-min intervals while volunteers are seated using a standardized mercury sphygmomanometer; the final two measurements will be averaged for the analysis.

Serum glucose, insulin, Homeostasis Model Assessment (HOMA) index, cholesterol, LDL, HDL, triacylglycerols, glutamate-pyruvate transaminase (GPT), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), gamma-glutamyltransferase

Table 1 Detailed study procedures

Visits (V) Week (W)	V1 (W-2)	V2 (W0)	V3 (W6)	V4 (W12)	Washout	V5 (W18)	V6 (W24)	V7 (W30)
Screening analysis	X							
Demographics/ general information	X							
Informed content form	X							
Randomization and allocation	X							
Treatment distribution	X							
Blood test		X		X		X		X
Stools collection		X	X	X		X	X	X
Hepatic ultrasound		X		X				X
Assessments								
General outcomes								
Clinical interview		X	X	X		X	X	X
Blood pressure and anthropometry		X	X	X		X	X	X
3-day dietary record		X		X		X		X
Food Frequency Questionnaire (FFQ)		X		X		X		X
Physical activity questionnaire (IPAQ)		X		X		X		X
Primary outcomes								
Plasma LPS		X		X		X		X
Secondary outcomes								
Blood Pressure		X	X	X		X	X	X
HOMA		X		X		X		X
Lipid profile		X		X		X		X
Inflammatory markers		X		X		X		X
Hepatic steatosis markers		X		X		X		X

(γ -GT), glycated haemoglobin, and C-reactive protein will be determined before and at the end of each intervention period by standard methods.

Inflammatory and CDV biomarkers, including adiponectin, resistin, myeloperoxidase (MPO), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1), will be measured using MILLIPLEXMAP test kits (Milliplex Map Kit, Millipore Corp, Billerica, MA). Arginase, prolidase and retinol binding protein-4 will be measured as hepatic steatosis markers. The arginase and prolidase activity will be measured according to Palomero-Rodríguez et al. [17] and Kayadibi et al. [18], respectively, whereas RBP-4 will be determined by ELISA technology (AdipoGen Inc).

For the study of intestinal microbiota composition, a 16S metagenomics sequencing will be performed. In brief, faecal DNA will be extracted using a commercial isolation kit (QIAamp DNA Stool Mimi Kit, Qiagen). The variable V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene will be PCR-amplified and sequenced on an Illumina MiSeq platform at Hospital Universitario San Cecilio, Spain, following the Illumina recommendations.

Withdrawal, dropout, discontinuation, and compliance

Withdrawal will be allowed at any time during the trial. Participants may be advised to discontinue the trial if there is no compliance or if a severe adverse event occurs. Women will be advised not to become pregnant during the study. Participants will be instructed to return the unconsumed capsules when collecting the follow-up doses. Participants whose compliance with treatments or placebo is $\leq 80\%$ of the total, those who

become pregnant and those who develop diabetes will be considered dropouts.

Adverse events and safety monitoring

All *Lactobacillus* strains are considered safe by the EFSA (European Food Safety Authority). However, each participant will be monitored for abdominal discomfort, diarrhoea, bloating, constipation and nausea/vomiting, among other possible effects, during each visit, and all unexpected adverse events will be reported by participants and written on the individual case report form by the investigator.

Sample size and power analysis

Based on the range and median value of LPS [8] and assuming a power of 80% and a significance level of 5%, the minimum number of subjects will be 21 per arm. To avoid possible bias caused by gender and taking into account withdrawal, we will be recruiting a total of 60 subjects. Missing data will be considered as unavailable data.

Statistical analysis

Data analyses will be performed at the end of the intervention, therefore, a replacement or substitution of a withdrawal subject is not planned; therefore, the missing data will be considered unavailable data.

The normality of variables will be assessed. Variables not following a normal distribution will be transformed. Normal variables will be expressed as the mean and standard error of the mean. An intention-to-treat analysis will be performed for the analysis of efficacy. In order to determine differences in basal characteristics, a paired *t*-test will be used. Carryover effects will be assessed by three-way ANOVA. A general lineal model for repeated measurements will be performed to evaluate differences between variables at the beginning, midpoint, and end of each intervention period. Two-way ANOVA will be used to determine the influence of treatment (probiotic or placebo) and time on the continuous dependent variables. Statistical analyses will be performed using IBM SPSS statistics v22.

Discussion

The present study has been designed to demonstrate whether a probiotic strain, *L. reuteri* V3401, is capable of reducing the IRS components together with healthy lifestyle recommendations (hypocaloric diet and physical activity).

Currently, altered intestinal microbiota is considered a new player in IRS based on its capacity to promote a state of low-grade systemic inflammation, insulin resistance and increased cardiovascular risk through mechanisms that include exposure to bacterial products such as LPS, a

component of the outer membrane of gram-negative bacteria. It is currently accepted that the increase in serum levels of LPS produces a metabolic endotoxaemia capable of modulating pro-inflammatory cytokines, as well as glucose and lipid metabolism in the liver and adipose tissue. There is scientific evidence to support the contribution of LPS in DM2 and obesity [7]. Additionally, on the basis of studies in both animals and humans, dietary intake appears to be a major regulator of the structure and function of the gut microbiota [19]. Therefore, promoting changes in the gut microbiota combined with an adequate Mediterranean diet might play an important role in ensuring the efficacy and success of reducing IRS components and avoiding DM2 development.

However, a relatively small number of randomized, clinically controlled studies assessing the beneficial effects of probiotics on metabolic syndrome parameters have been reported. When looking for a specific clinical response, special care must be taken when selecting the strain because probiotic effects are strain specific [12]. The effects of probiotics are explained by their contribution to the intestinal microbiota composition, maintenance of gut barrier function and their immunomodulation capacity [10, 12].

As mentioned above, the most commonly used strains of probiotics are *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. The consumption of *L. acidophilus* NCFM has been described to preserve insulin sensitivity without affecting systemic inflammation [20]. Furthermore, *L. reuteri* LR6 has been shown to decrease total cholesterol values and increase HDL-cholesterol levels in the plasma of rats fed a hypercholesterolemic diet [21]. In humans, enrichment of gut microbiota with *L. reuteri* SD5865 has been reported to increase insulin secretion, possibly due to augmented incretin release, although this strain does not seem to affect insulin sensitivity or body fat distribution [22]. However, in a correlation study, Million et al. detected *L. reuteri* in 20% of their study population, with occurrence increasing along with BMI values (7, 8, 34 and 22% for anorexic, lean, overweight and obese individuals, respectively) [23].

To the best of our knowledge, no studies have tested the possible beneficial effect of *L. reuteri* V3401 in patients with IRS. Based on the background provided above, we propose to study the *L. reuteri* V3401 strain by means of an intervention study in subjects with IRS who will follow a healthy lifestyle (hypocaloric diet and physical activity).

Additional files

Additional file 1: SPIRIT 2013 Checklist: Recommended items to address in a clinical trial protocol and related documents. (DOC 120 kb)

Additional file 2: Clinical interview guide. (DOC 27 kb)

Abbreviations

BMI: Body Mass Index; CfU: Colony forming units; CVD: Cardiovascular disease; DM2: Diabetes mellitus 2; EFSA: European Food Safety Authority; FFQ: Food Frequency Questionnaire; GOT: Glutamate-oxalacetate transaminase; GPT: Glutamate-pyruvate transaminase; HDL: Serum high-density lipoprotein; HOMA: Homeostasis Model Assessment; IDF: International Diabetes Federation; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; IPAQ: International Physical Activity Questionnaire; IRS: Insulin resistance syndrome; LBP: Serum LPS binding protein; LPS: Lipopolysaccharide; MPO: Myeloperoxidase; NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; sICAM-1: Soluble intracellular adhesion molecule-1; sVCAM-1: Vascular adhesion molecule-1; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; US: Ultrasound; γ -GT: Gamma-glutamyltransferase

Acknowledgements

This paper will be part of Carmen Tenorio Jimenez's doctorate, which is being completed as part of Programa de Doctorado en Seguridad de los Alimentos at the University of Jaén, Spain.

Funding

This study is part of the project titled "Guía para la sustanciación de declaraciones de salud en alimentos: funciones inmune, cognitiva y síndrome metabólico". The PROSIR study has been supported by the company Biosearch life, Spain, through grant #3006 managed by Fundación General Empresa-Universidad de Granada, Spain.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

CTJ, MJMR (physician responsible for the intervention), LF, AG, MO and CGLL contributed to the conception and design the study. MTL, CAI, IDC will participate in the clinical study as a part of the medical team. JHM will be responsible for the IPAQ analysis. All authors have read and approved the final version of the manuscript. All the authors will have access to the final database for analysing results. CGLL, AG, JO, JPD will be responsible for the data analysis and the statistical analysis. CTJ and CGLL wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol and written informed consent were approved by the Institutional Review Board of the Jaén Hospitals (Comité de Ética de la Investigación de Jaén, Ref. 25/02/2016) and from the Review Board of the Granada Hospitals (Comité de Ética de la Investigación Biomédica de la Provincia de Granada, CEI-GRANADA, Ref.28/01/2016). Written informed consent will be obtained from each patient, according to the BSSPA procedures. Data anonymity will be used during the entire process. Finally, the clinical data of the subjects will be kept in the Complejo Hospitalario de Jaén facilities.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

MO who participated in study is the Research Director of the Department of Research and Development at Biosearch life. The funding has no role in the recruitment, biological sample analysis, statistical analysis, data interpretation. None of the authors has any conflict of interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición. Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain. ²Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Jaén, Spain. ³Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo. Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University of Granada, Granada, Spain. ⁵Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Centre of Biomedical Research, University of Granada, Campus de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain. ⁶Instituto de Investigación

Biosanitaria, iberGRANADA, Granada, Spain. ⁷CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition CB12/03/30028 (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁸PROFITH "PRoMoting FITness and Health through physical activity" Research Group, Department of Physical Education and Sports, Faculty of Sport Sciences, University of Granada, Ctra. Alfacar s/n, 18011 Granada, Spain. ⁹Biosearch Life, Granada, Spain.

Received: 16 February 2018 Accepted: 6 November 2018

Published online: 20 November 2018

References

- Kushner RF, Kahan S. Introduction: the state of obesity in 2017. *Med Clin North Am.* 2018;102(1):1–11.
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JJ, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; world heart federation; international atherosclerosis society; and International Association for the Study of obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640–5.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, 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.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(3):979–84.
- Tumbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027–131.
- Tumbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrisat B, Heath AC, Knight R, Gordon JL. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480–4.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Castella L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic Endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761–72.
- Lassenius MI, Pietiläinen KH, Pussinen PJ, Syrjänen J, Forsblom C, Pöörsti I, Rissanen A, Kaprio J, Mustonen J, Groop PH, Lehto M. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care.* 2011;34:1809–15.
- Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, Wu H, Chen Y, Dore J, Clément K, Hu FB, Lin X. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care.* 2010; 33(9):1925–32.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160–74.
- Plaza-Díaz J, Fernández-Caballero JA, Chueca N, García F, Gómez-Llorente C, Sáez-Lara MJ, Fontana L, Gil Á. Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients.* 2015;7(6):3999–4015.
- Miglioranza Scavuzzi B, Miglioranza LH d S, Henrique FC, Pitelli Paroschi T, Lozovoy MAB, Simão ANC, Dichi I. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(8):1127–38.
- Sañudo Otero AI, Criado García R, Rodríguez Nogales A, Garach Domech A, Olivares Martín M, Gálvez Peralta JJ, De La Escalera Hueso S, Duarte Pérez JM, Zarzuelo Zurita A, Bañuelos Hortigüela O. Probiotic strains having cholesterol absorbing capacity, methods and uses thereof. Google Patents; 2016. <https://encrypted.google.com/patents/EP3031930A1?cl=en&hl=es> Accessed 14 Jan 2018.
- Vijayananthan A, Nawawi O. The importance of good clinical practice guidelines and its role in clinical trials. *Biomed Imaging Interv J.* 2008;4(1):e5.
- American Diabetes Association. 5. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41 Suppl 1: 51–4.
- Csendes P, Paolinelli P, Busel D, Venturelli V, Rodríguez J. Hígado graso: Ultrasonido y correlación anatomopatológica. *Rev Chil Radiol.* 2004;10:50–2.
- Palomero Rodríguez MA, García Navas R, Laporta Báez Y, Al Kassam Martínez D, de Vicente Sánchez J, Cacharro Moras LM, Sánchez Conde P,

- Mollinedo F, Muriel Villoria C. Relationship between arginase activity and the storage time of packed red blood cells. *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 2012;59(6):315–20.
18. Kayadibi H, Gültepe M, Yasar B, Ince AT, Özcan O, İpicioğlu OM, Kurdas OO, Bolat B, Benek YZ, Guveli H, Atalay S, Ozkara S, Keskin O. Diagnostic value of serum prolidase enzyme activity to predict the liver histological lesions in non-alcoholic fatty liver disease: a surrogate marker to distinguish steatohepatitis from simple steatosis. *Dig Dis Sci.* 2009;54(8):1764–71.
 19. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369–79.
 20. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, Jakobsen M, Pedersen BK. Effects of lactobacillus acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr.* 2010;104(12):1831–8.
 21. Singh TP, Malik RK, Katkamwar SG, Kaur G. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus reuteri* LR6 in rats fed on high-cholesterol diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(1):71–5.
 22. Simon MC, Strassburger K, Nowotny B, Kolb H, Nowotny P, Burkart V, Zivehe F, Hwang JH, Stehle P, Pacini G, Hartmann B, Holst JJ, MacKenzie C, Bindels LB, Martinez I, Walter J, Henrich B, Schloot NC, Roden M. Intake of lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept. *Diabetes Care.* 2015;38(10):1827–34.
 23. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, Vialettes B, Raoult D. Correlation between body mass index and gut concentrations of lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and Escherichia coli. *Int J Obes Nat.* 2013;37(11):1460–6.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO III



Article

***Lactobacillus reuteri* V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study**

Carmen Tenorio-Jiménez ¹, María José Martínez-Ramírez ^{2,3}, Isabel Del Castillo-Codes ⁴, Carmen Arraiza-Irigoyen ², Mercedes Tercero-Lozano ⁴, José Camacho ⁵, Natalia Chueca ^{6,7}, Federico García ^{6,7}, Josune Olza ⁸, Julio Plaza-Díaz ^{7,8,9,10}, Luis Fontana ^{7,8,9}, Mónica Olivares ¹¹, Ángel Gil ^{7,8,9,10} and Carolina Gómez-Llrente ^{7,8,9,10,*}

- ¹ Endocrinology and Nutrition Clinical Management Unit, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain
- ² Endocrinology and Nutrition Clinical Management Unit, University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain
- ³ Department of Health Sciences, School of Health Sciences, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain
- ⁴ Digestive Diseases Clinical Management Unit, University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain
- ⁵ Department of Signal Theory, Networking, and Communications, University of Granada, 18071 Granada, Spain
- ⁶ Department of Microbiology, University Hospital Campus de la Salud, 18016 Granada, Spain
- ⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA, 18012 Granada, Spain
- ⁸ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain
- ⁹ Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Granada, Spain
- ¹⁰ CIBEROBN (CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- ¹¹ Biosearch Life, 18004 Granada, Spain
- * Correspondence: gomezll@ugr.es; Tel.: +34-958-241-000 (ext. 40092)

Received: 27 June 2019; Accepted: 29 July 2019; Published: 31 July 2019



Abstract: Previous studies have reported that probiotics may improve clinical and inflammatory parameters in patients with obesity and metabolic syndrome (MetS). *Lactobacillus* (*L.*) *reuteri* V3401 has shown promising results on the components of MetS in animal studies. We aimed to evaluate the effects of *L. reuteri* V3401 together with healthy lifestyle recommendations on adult patients with MetS. Methods: We carried out a randomized, crossover, placebo-controlled, single-center trial in which we included 53 adult patients newly diagnosed with MetS. Patients were block randomly allocated by body mass index (BMI) and sex to receive a capsule containing either the probiotic *L. reuteri* V3401 (5×10^9 colony-forming units) or a placebo once daily for 12 weeks. Anthropometric variables, biochemical and inflammatory biomarkers, as well as the gastrointestinal microbiome composition were determined. Results: There were no differences between groups in the clinical characteristics of MetS. However, we found that interleukin-6 (IL-6) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) diminished by effect of the treatment with *L. reuteri* V3401. Analysis of the gastrointestinal microbiome revealed a rise in the proportion of *Verrucomicrobia*. Conclusions: Consumption of *L. reuteri* V3401 improved selected inflammatory parameters and modified the gastrointestinal microbiome. Further studies are needed to ascertain additional beneficial effects of other probiotic strains in MetS as well as the mechanisms by which such effects are exerted.

Keywords: metabolic syndrome; gastrointestinal microbiome; *Lactobacillus reuteri* V3401; probiotics; obesity

1. Introduction

Obesity is a chronic disease, affecting developed and developing countries, that has multiple comorbidities and deteriorates quality of life. It is characterized by an increase of fat mass, which can consequently produce hypertrophy of the adipocytes, leading to an altered adipose tissue functionality. Individuals who are obese can develop an insulin resistance syndrome, also called metabolic syndrome (MetS). MetS is defined by insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, and increased abdominal circumference, and it is associated with the development of type 2 diabetes (DM2), cardiovascular disease (CVD), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). This condition is associated with a two-fold increase in the risk of coronary heart disease, cerebrovascular disease, and a 1.5-fold increase in the risk of all-cause mortality [1], constituting a major public health challenge worldwide.

Nowadays, there is sound evidence linking the metabolic dysfunction seen in MetS to a proinflammatory state. Adipose tissue is, in part, responsible of this low-grade inflammatory state through the increasing release of proinflammatory molecules, such as leptin and tumor necrosis factor α (TNF- α), and the inhibition of adiponectin secretion, an anti-inflammatory adipokine [2]. In recent years, it has become evident that alteration of the gastrointestinal microbiome, also called gastrointestinal dysbiosis, may also contribute to the development of insulin resistance associated with obesity [3–5]. Furthermore, different studies have linked gastrointestinal dysbiosis with the development of obesity and other hallmarks of MetS [6,7]. In this sense, a decreased ratio of *Bacteroidetes*/*Firmicutes* has been described in individuals who are obese compared to normal-weight individuals [7]. Likewise, individuals with a low bacterial richness have more dyslipidemia, insulin resistance, inflammatory phenotype, and overall adiposity than individuals with high bacterial richness [8]. In addition, an aberrant gastrointestinal microbiome can promote subacute systemic inflammation, insulin resistance, and increased risk of CVD by mechanisms that include exposure to bacterial products, such as lipopolysaccharide (LPS), which is responsible for the metabolic endotoxemia related to MetS [9].

In the last years, treatment of the hallmarks of MetS with probiotics has emerged as a promising therapy. Probiotics are living microorganisms that confer health benefits to the host when administered in adequate amounts [10]. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are the most frequently used genera of probiotics used in humans. Some of the beneficial effects of probiotics are mediated by their capacity to normalize the gastrointestinal microbiome, reinforce the gut barrier function composition [11,12], and their immunomodulatory actions [12,13]. Therefore, the addition of probiotics to a healthy diet could represent an interesting tool to fight obesity, MetS, and associated inflammation when used alongside dietary management and lifestyle modifications (e.g., increased physical activity). In this regard, some studies have found an improvement of anthropometric parameters and a decrease in inflammatory biomarkers in this disease after probiotic administration [14]. However, the beneficial effects of probiotics on MetS components are contradictory [15], probably because of the different probiotic strains, doses, and clinical study designs.

Lactobacillus (L.) reuteri V3401 strain, deposited in the Spanish Type Culture Collection (CECT) with accession number CECT 8695, was isolated from cow's raw milk on Mark, Rogosa and Sharper (MRS) agar medium, and 16S gene sequence analysis was carried out for its identification. In addition, its carbohydrate fermentation ability was characterized by the Analytical Profile Index (API) CH50 test [16]. This strain has been shown to reduce the absorption of fluoresterol, a fluorescent cholesterol analogue, by HT-29 human enterocytes [16]. Furthermore, Wistar rats fed a hypercholesterolemic diet supplemented with the probiotic strain for 57 days showed HDL levels similar to those of a healthy control group fed a standard diet [16]. Regarding glycemic levels, hypercholesterolemic animals

supplemented with the probiotic strain showed similar values to those of normocholesterolemic mice, whereas animals under a hypercholesterolemic diet without the probiotic strain exhibited higher levels than normocholesterolemic mice [16]. Higher glucose levels are related to insulin resistance, which is normally associated with hypercholesterolemia and low HDL levels, both of them components of MetS. In this setting, supplementation with *L. reuteri* V3401 might offer an additional metabolic advantage together with healthy diet and exercise recommendations in patients with MetS.

All things considered, the present study aimed to evaluate whether the consumption of the probiotic strain *L. reuteri* V3401, together with healthy lifestyle (hypocaloric diet and physical activity) recommendations, was capable of improving MetS components. For this purpose, we designed a double-blind, crossover, placebo-controlled, single-center, randomized clinical trial (RCT).

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

All research and procedures performed during the study complied with the Declaration of Helsinki and the Guidelines of Good Clinical Practice. After receiving a complete verbal description of the study, patients signed a written informed consent. The study protocol was approved by the local Ethics Committee of both Granada and Jaén (references CEI-Jaén 25022016 and CEI-Granada 28022016, respectively).

2.2. Subjects and Experimental Design

We performed a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled, single-center trial in patients with a new diagnosis of MetS, according to the criteria of the International Diabetes Federation (IDF). The complete study design including sample size, randomization, and the trial protocol have been previously published [17] and registered at www.clinicaltrials.gov as NCT02972567. The study was conducted in agreement with the Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) guidelines.

Sample size was calculated based on the range and median value of lipopolysaccharide (LPS) and assuming a power of 80% and a significant level of 5% [17]. In brief, a total of 53 out of 60 adult patients were recruited at the Endocrinology and Nutrition Clinical Management Unit, University Hospital of Jaén (Jaén, Spain) by qualified personnel. Patients were block randomly allocated, by BMI and sex, in a 1:1 ratio to receive a capsule containing either the probiotic *L. reuteri* V3401 (5×10^9 colony-forming units) or the placebo (maltodextrin) once daily for 12 weeks.

Both capsules, probiotic and placebo, were provided by Biosearch Life (Granada, Spain). In addition, participants received an intensive lifestyle intervention program that included nutritional and physical counseling to achieve and maintain a 7% loss of initial body weight and increase moderate-intensity physical activity for at least 150 min/week. In Figure 1 we summarized the experimental design of the study.

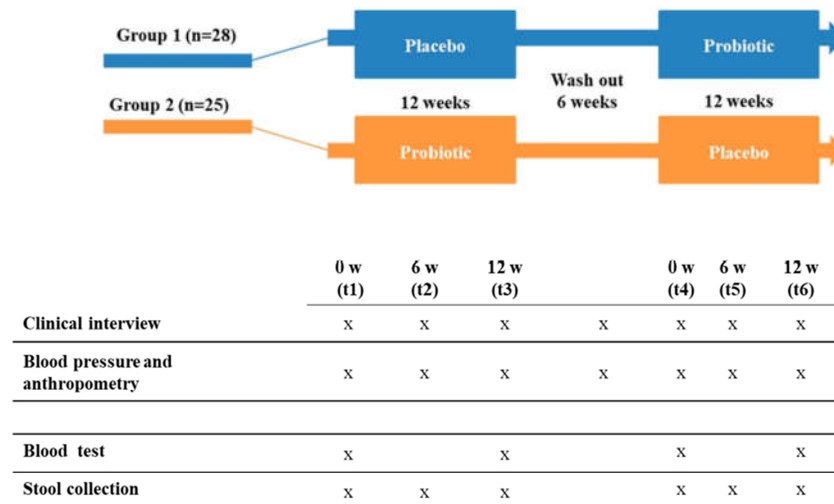


Figure 1. Illustration of the experimental design: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled, single-center trial comparing the effect of consumption of *Lactobacillus reuteri* V3401 for 12 weeks on various clinical, biochemical, and inflammatory biomarkers and gastrointestinal microbiota. w: weeks; t: time; x: sample collection.

2.3. Anthropometric, Biochemical, Inflammatory, and Cardiovascular Data

We performed a systematic symptom evaluation on each visit, with special emphasis on gastrointestinal symptoms, and a physical examination. Body weight (kg), height (cm), and waist circumference (cm) were measured by the same person using standardized procedures. Blood pressure was taken 3 times by the same person, and the mean of the three values was included. The biochemical analyses, including lipid and glucose metabolism, were performed at the University Hospital of Jaén following internationally accepted quality control protocols. Homeostasis assessment model for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using fasting plasma glucose and insulin values.

Blood samples were collected from each patient and after 12 h of fasting, at the beginning and the end of each intervention period. Serum and plasma samples were collected by centrifugation of blood samples and kept at -80°C until analysis.

Plasma adipokines as well as cardiovascular and inflammatory biomarkers—adiponectin, leptin, resistin, IL-6, IL-8, TNF- α , total plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), hepatocyte growth factor (HGF), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), soluble intracellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), and myeloperoxidase (MPO)—were analyzed on a Luminex 200 system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) with human monoclonal antibodies (EMD Millipore Corp, Billerica, MA, USA) using MILLIplex™ kits (HADK1MAG-16K, HSTCMAG-28SK, HAD2MAG-61K, HCVD2MAG-67K) according to the manufacturer's recommendations.

LPS and LPS-binding protein (LBP) were determined in serum samples using CEB526GE and SEB406 HU ELISA kits (Cloud-Clone Corp, TX, USA), respectively, following the manufacturer's instructions.

2.4. Fecal Samples, DNA Extraction, and Next-Generation Sequencing

Fecal samples were collected from each patient at each time (t1, t2, t2, t4, t5, and t6). Fecal samples were placed inside of a sterile plastic bottle and kept at -80°C until analysis. DNA was extracted using a QIAamp DNA stool Mini Kit (QIAGEN, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's instructions, with the exception that samples were incubated with the lysis buffer at 95°C instead of

70 °C to guarantee the lysis of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Extracted DNA samples were sequenced at facilities of the Department of Microbiology, University Hospital Campus de la Salud (Granada, Spain). A 16S metagenomics sequencing was performed following the Illumina protocol.

In summary, the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using the primers described by Klindworth et al., 2013 [18]. The PCR mixture was composed of 5 µL for each forward and reverse primers (1 µM, Macrogen, Seoul, Korea), 2.5 µL of DNA template samples, and 12.5 µL of 1x Hot Master Mix (KAPA HiFi HS RM, Roche, Basilea, Switzerland) to a final volume of 25 µL. Five microliters of elution solution was used for the negative control. The PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 30 s, and a final elongation at 72 °C for 5 min. The PCR products were demonstrated by electrophoresis on a 2% agarose gel. No amplification product was observed in the negative control. The amplifications were subjected to purification using Ampure beads (Agencourt Bioscience, La Jolla, CA, USA), the eluted DNA product was quantified using the assays of the Qubit kit (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA), and then all samples were pooled in equal concentrations for sequencing. Bioanalyzer 2100 was used with the DNA 1000 Chip kit (Agilent, Palo Alto, CA, USA) to evaluate the quality of the final products for each sample individually. Sequencing was carried out using Illumina MiSeq paired-end sequencing in an Illumina MiSeq device (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with 600 cycles (300 cycles for each paired reading and 12 cycles for the sequence of bar codes) according to the manufacturer's instructions. Sequence analysis was performed using the metagenomic workflow based on 16S of MiSeq Reporter v2.3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

2.5. Taxonomic Analysis

The “Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2” (QIIME 2) package was used to analyze sequence data [19]. Denoising quality, chimera check, and clustering were performed using the DADA2 plugins implemented in QIIME 2. Amplicon sequence variants (ASVs) with a relative proportion lower than 0.1% were eliminated; as a result, the total numbers of ASV were reduced to 2015 but with a very low impact on the total data. The GreenGenes database (version 13.8), together with the naïve Bayes algorithm, was used as the reference 16S database.

2.6. Statistical Analysis

For the anthropometric, biochemical, and inflammatory biomarkers, results are presented as the mean values $\pm$ standard deviation (SD), unless otherwise indicated. For those variables not following a normal distribution, we applied the logarithmic transformation (insulin, HOMA index, glycated hemoglobin, total cholesterol, triacylglycerols, alanine aminotransferase (GPT), gamma glutamyltransferase (γ GT), C reactive protein (CRP), IL-6, IL-8, adiponectin, resistin, HGF, sICAM, sVCAM and LBP) or the inverse transformation (high-density lipoprotein (HDL), aspartate aminotransferase (GOT)).

Only patients with less than 5 missing data were considered, resulting in a final number of 34 patients. Missing data in these patients were imputed using principal component analysis (PCA) and trimmed score regression (TSR) [20]. The treatment effect in anthropometric, biochemical, and inflammatory biomarkers was evaluated according to the approach described by Wellek et al. [21]. Two tests were carried out: (i) a pretest for significance of carryover effects, and (ii) a test for significance of treatment effects. The treatment effects were considered significant for those biomarkers for which the null hypothesis of the pretest was not rejected and the null hypothesis of the test was rejected ($p < 0.05$), confirming that the biomarker presented statistically significant differences only due to treatment effects. p -value computations were confirmed with different state-of-the-art multivariate approaches, including multivariate analysis of variance (MANOVA) [22], partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) [23], and ANOVA simultaneous component analysis (ASCA) [24]. TheMEDA toolbox (<https://github/josecamachop/MEDA-Toolbox>) and the MANCOVAN toolbox (<http://www.mathworks>).

[com/matlabcentral/fileexchange/27014-mancovan](https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27014-mancovan)) in Matlab (Mathworks) were used to perform the statistical analysis.

For the gastrointestinal microbiota analysis, the generated sequences, ASV, were normalized by means of the rarefaction method (Figure S1). The alpha diversity was measured by means of the Shannon index, whereas the unique fraction metric (Unifrac), both weighted and unweighted, was used to determine the beta diversity. When comparing the incremental of relative bacteria proportions before and after treatment (delta), a pairwise Wilcoxon signed-rank test was used. *p*-values were adjusted by False discovery rate-FDR (*q*-values).

3. Results

3.1. Anthropometric, Biochemical, and Inflammatory Data

Anthropometric and biochemical characteristics of the subjects are described in Table 1, whereas in Table 2 the inflammatory biomarkers determined in blood samples are described.

In the case of BMI, diastolic blood pressure, GOT, and LBP, we found that the washout period was not long enough to avoid the carryover effects. We found significant differences for IL-6, sVCAM (Figure 2), and insulin levels (Table 1); however, we did not find any significant results for HOMA index (Table 1).

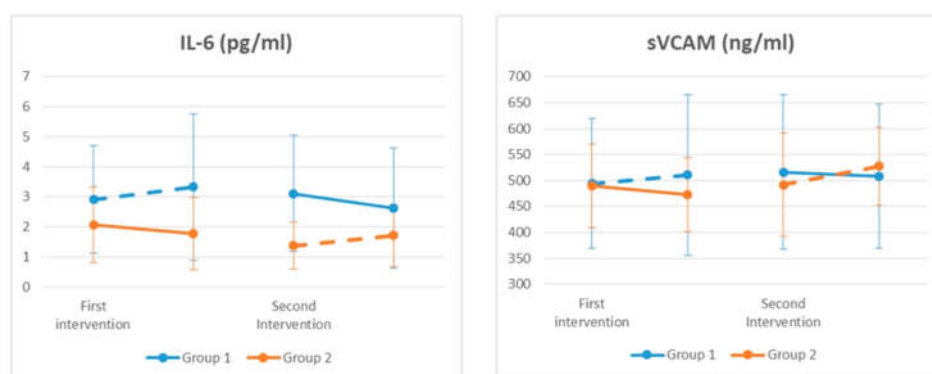


Figure 2. Inflammatory biomarkers throughout the study. The levels of interleukin 6 (IL-6) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM) were modified by the probiotic consumption ($p < 0.05$). Continuous line: probiotic group. Discontinuous line: placebo group.

3.2. Gastrointestinal Microbiome Composition

We characterized the gastrointestinal microbiome composition of the participants at the beginning, middle, and end of each intervention period (Table S1). However, we were unable to determine the specific presence of the *L. reuteri* V3401 strain in fecal samples due to the lack of specific primers for this strain. As shown in Figure 3, at the beginning of the intervention, the most abundant phyla were *Firmicutes* and *Bacteroidetes* followed by *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, and *Cyanobacteria*.

Table 1. Anthropometric and biochemical characteristics of the patients.

	Group 1				Group 2			
	Placebo		Probiotic		Probiotic		Placebo	
	t1	t3	t4	t6	t1	t3	t4	t6
Weight (kg)	109.02 ± 26.7	105.70 ± 26.2	101.50 ± 24.5	101.08 ± 24.2	103.49 ± 15.2	96.56 ± 16.2	93.91 ± 16.9	92.0 ± 17.3
BMI (kg/m ²)	38.76 ± 7.2	37.57 ± 7.1	36.77 ± 6.8	36.56 ± 6.6	38.30 ± 7.3	35.69 ± 7.1	34.57 ± 6.9	33.80 ± 6.6
SBP (mm Hg)	137.68 ± 16.9	133.28 ± 15.4	133.11 ± 20.4	132.21 ± 14.6	139 ± 22.6	129.95 ± 16.0	131.30 ± 20.0	131.40 ± 18.6
DBP (mm Hg)	84.28 ± 9.6	81.96 ± 7.7	81.68 ± 11.0	82.11 ± 10.5	87.95 ± 14.3	78.18 ± 10.4	78.85 ± 12.4	81.60 ± 11.2
Glucose (mg/dL)	103.29 ± 11.0	108.08 ± 11.5	106.74 ± 8.9	105.53 ± 10.5	101.0 ± 13.9	103.68 ± 13.4	101.22 ± 11.8	103.78 ± 16.5
Insulin (mU/mL)	17.50 ± 10.6	16.18 ± 11.3	22.44 ± 10.3	21.74 ± 11.7	14.24 ± 8.5	12.42 ± 10.9	14.04 ± 6.1	17.47 ± 7.8
HOMA index	4.48 ± 2.8	4.41 ± 3.3	5.91 ± 2.8	5.66 ± 3.5	3.71 ± 2.7	3.52 ± 3.6	3.64 ± 1.7	4.46 ± 2.2
Glycated Hemoglobin (%)	5.59 ± 0.4	6.04 ± 2.2	5.44 ± 0.3	5.49 ± 0.3	5.68 ± 0.4	5.90 ± 1.9	5.46 ± 0.3	5.44 ± 0.3
Total cholesterol (mg/dL)	232.42 ± 43.0	207.08 ± 36.0	202.79 ± 45.8	224.16 ± 45.5	233.41 ± 46.5	203.64 ± 37.9	209.56 ± 58.0	220.89 ± 53.8
Triacylglycerols (mg/dL)	119.25 ± 47.6	122.46 ± 59.9	109.00 ± 47.3	118.89 ± 52.2	130.55 ± 47.5	128.23 ± 57.6	112.89 ± 42.7	100.56 ± 62.6
LDL (mg/dL)	156.79 ± 35.7	131.71 ± 30.0	128.11 ± 32.5	144.42 ± 39.0	161.0 ± 41.6	132.91 ± 32.1	136.22 ± 47.7	145.72 ± 44.5
HDL (mg/dL)	50.54 ± 14.6	50.46 ± 12.2	52.47 ± 13.3	54.11 ± 10.2	45.95 ± 9.5	44.68 ± 7.9	50.44 ± 10.3	54.61 ± 11.5
GOT (U/L)	25.75 ± 7.7	22.83 ± 6.3	22.63 ± 6.8	22.32 ± 5.7	23.55 ± 12.4	25.50 ± 14.9	20.56 ± 6.1	21.33 ± 6.2
GPT (U/L)	34.79 ± 17.4	28.17 ± 14.3	22.42 ± 11.9	27.89 ± 12.7	24.38 ± 8.9	22.24 ± 8.4	18.00 ± 7.5	22.50 ± 11.0
γ-GT (U/L)	36.29 ± 13.6	37.08 ± 16.7	38.42 ± 18.9	36.74 ± 21.2	26.05 ± 12.7	24.91 ± 14.2	24.89 ± 14.3	24.00 ± 15.4

Values are expressed as means ± SD. BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HOMA-IR: Homeostasis assessment model for insulin resistance; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; GOT: aspartate aminotransferase; GPT: alanine aminotransferase; γ-GT: gamma glutamyltransferase.

Table 2. Inflammatory biomarkers.

	Group 1				Group 2			
	Placebo		Probiotic		Probiotic		Placebo	
	t1	t2	t3	t5	t1	t2	t3	t5
CRP (mg/dL)	5.13 ± 3.7	5.78 ± 4.8	6.97 ± 7.4	5.52 ± 4.4	5.88 ± 4.4	6.12 ± 6.3	3.66 ± 2.7	4.24 ± 3.8
IL-6 (pg/mL)	2.91 ± 1.8	3.33 ± 2.4	3.12 ± 1.9	2.62 ± 2.0	2.07 ± 1.2	1.79 ± 1.2	1.37 ± 0.8	1.72 ± 1.0
IL-8 (pg/mL)	2.86 ± 1.7	2.80 ± 1.2	4.11 ± 7.1	4.23 ± 9.4	2.66 ± 1.1	2.73 ± 1.2	2.27 ± 1.0	2.28 ± 1.1
TNF-α (pg/mL)	4.70 ± 2.5	4.91 ± 2.6	4.59 ± 2.1	3.51 ± 1.7	4.05 ± 1.9	4.15 ± 2.1	3.05 ± 1.2	3.28 ± 2.0
Adiponectin (mg/L)	6.55 ± 5.1	5.95 ± 4.7	5.82 ± 3.8	6.56 ± 3.4	5.69 ± 3.7	6.91 ± 6.5	7.20 ± 4.4	8.26 ± 6.1
tPAI1 (μg/L)	9.24 ± 4.9	9.55 ± 4.3	10.55 ± 4.8	11.56 ± 7.1	9.31 ± 3.2	8.36 ± 2.6	9.08 ± 3.2	9.51 ± 3.6
P-selectin (ng/mL)	46.78 ± 19.7	46.70 ± 21.2	49.26 ± 22.8	63.47 ± 38.3	48.06 ± 16.7	40.51 ± 11.4	60.73 ± 35.4	58.09 ± 21.6
Resistin (μg/L)	17.71 ± 8.1	17.70 ± 13.7	16.99 ± 5.2	17.45 ± 10.4	15.33 ± 7.2	11.89 ± 5.2	11.08 ± 4.0	12.60 ± 5.2
HGF (pg/mL)	161.12 ± 97.9	155.73 ± 93.6	131.45 ± 65.9	162.45 ± 88.3	175.06 ± 75.1	170.17 ± 72.7	160.47 ± 68.8	157.95 ± 57.5
Leptin (μg/L)	28.56 ± 14.8	24.07 ± 12.3	23.71 ± 13.8	18.42 ± 10.5	21.97 ± 11.8	17.68 ± 10.9	13.67 ± 9.3	14.24 ± 10.4
MCP-1 (pg/mL)	107.53 ± 39.3	106.57 ± 31.7	120.07 ± 60.1	118.20 ± 46.8	108.86 ± 39.3	114.61 ± 51.5	116.31 ± 43.6	112.51 ± 41.2
sICAM (ng/mL)	73.65 ± 37.2	73.71 ± 41.1	67.86 ± 35.2	65.47 ± 32.2	74.80 ± 26.9	71.50 ± 33.1	75.17 ± 40.2	73.0 ± 41.2
MPO (ng/mL)	17.69 ± 5.9	19.96 ± 10.7	20.70 ± 13.2	30.53 ± 21.2	15.56 ± 7.8	18.14 ± 13.0	17.31 ± 12.4	19.46 ± 10.2
sVCAM (ng/mL)	494.22 ± 125.1	511.04 ± 154.8	516.47 ± 149.1	507.61 ± 138.7	489.68 ± 80.9	472.72 ± 71.4	491.62 ± 99.6	527.43 ± 74.6
LPS (ng/mL)	285.81 ± 107.2	277.90 ± 116.3	312.22 ± 126.0	326.19 ± 166.0	321.82 ± 105.4	316.83 ± 124.0	309.91 ± 136.7	308.70 ± 131.4
LBP (ng/mL)	731.26 ± 512.2	782.55 ± 323.0	635.96 ± 294.2	747.39 ± 272.6	837.47 ± 423.5	742.81 ± 349.2	833.63 ± 560.5	855.78 ± 663.1

Values are expressed as means ± SD. CRP: C reactive protein; IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; tPAI1: plasminogen activator inhibitor-1; HGF: hepatocyte growth factor; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; sICAM: soluble intracellular adhesion molecules 1; sVCAM: soluble vascular cell adhesion molecule 1; MPO: myeloperoxidase; LPS: lipopolysaccharide; LBP: lipopolysaccharide-binding protein.

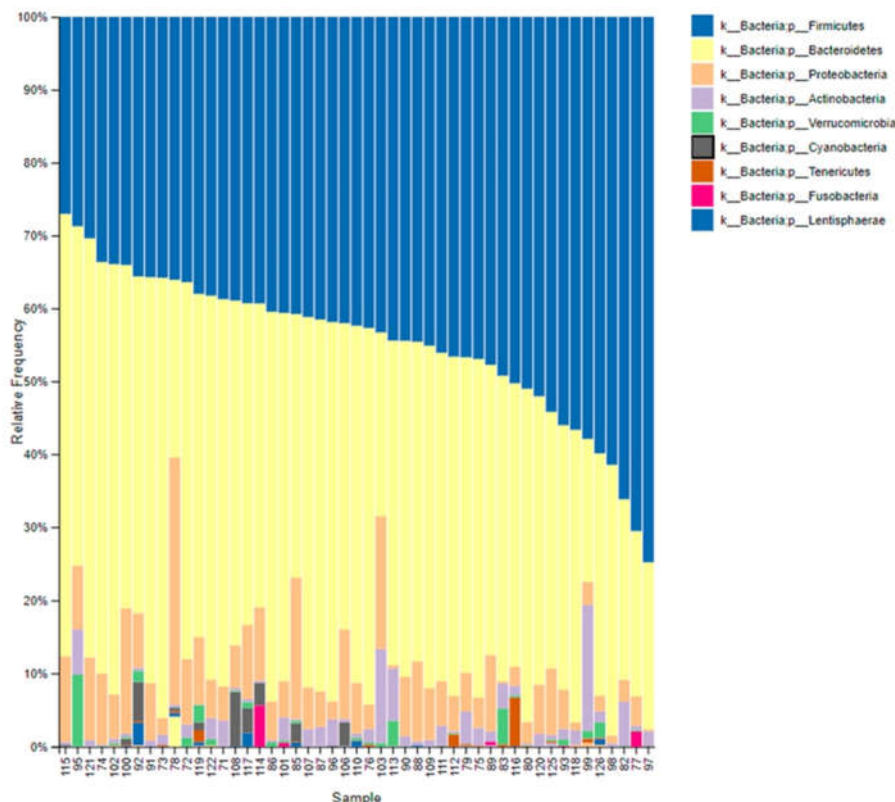


Figure 3. Baseline gastrointestinal microbiome composition. Taxonomic composition of the gastrointestinal communities at the beginning of the intervention. The figure shows bar charts of the relative abundance of bacteria at the phylum level. Each column represents a participant.

Regarding the bacterial diversity, we did not find significant differences in the alpha diversity throughout the study, measured as the Shannon index (H) (Figure S2), or in the beta diversity (Figure S3). Therefore, our next analysis was to determine the evolution of the relative proportion of specific taxa, namely *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Tenericutes*, and *Lentisphaerae*. It is worth mentioning there was an increase in the relative proportion of the *Verrucomicrobia* phylum in the participants that consumed the probiotic strain (Figure 4A). The same results were found in the *Akkermansia* genus (Figure 4B).

Based on the results described above, we decided to determine whether there were significant differences in the relative abundance of these taxa due to the treatment (probiotic versus placebo). We, therefore, performed a pairwise comparison [25]. During the first intervention (t1, t2, and t3) we observed a significant increase in the delta values (t3–t1) in the *Verrucomicrobia* phylum due to the treatment (probiotic versus placebo). However, during the crossover intervention, the differences (t6–t4) were not statistically significant, although we found a significant trend (FDR $p = 0.07$) (Figure 5).

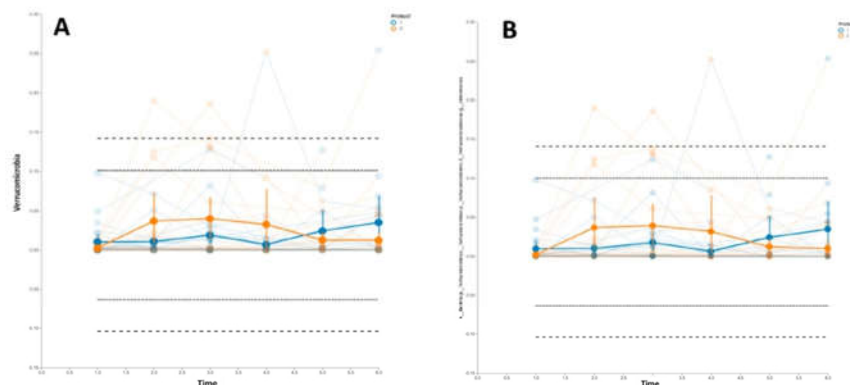


Figure 4. Trend of the relative proportion of *Verrucomicrobia* phylum and *Akkermansia* genus. The thick lines with error bars represent the means of both groups (Group 1: blue lines; group 2: orange lines). Dashed lines represent the means $\pm$ 2 and 3 standard deviations. Group 1 started the intervention receiving the placebo (t1, t2, and t3) and then was switched to receive the probiotic strain (t4, t5, and t6). Group 2 started the intervention receiving the probiotic strain (t1, t2, and t3) and then was switched to receive the placebo (t4, t5, and t6). (A) Temporal trend of *Verrucomicrobia* phylum; (B) Temporal trend of *Akkermansia* genus.

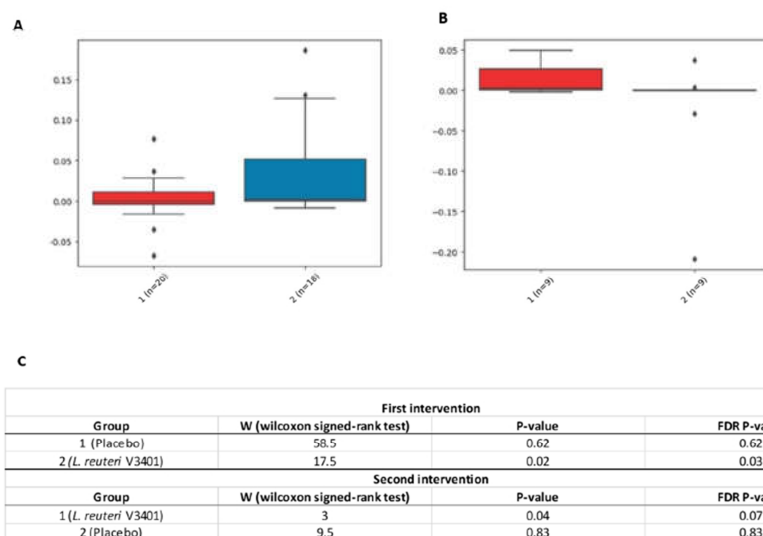


Figure 5. Relative abundance of the delta values of *Verrucomicrobia* phylum. The box plots indicate the relative abundance of *Verrucomicrobia* phylum between the final and the beginning points of each intervention—t3-t1 (A) and t6-t4 (B)—due to the treatment and the number of patients (n) of each group and treatment. (A) shows data for the first part of this intervention study (First intervention, 1: placebo; 2: *L. reuteri* V3401), whereas (B) shows data from the intervention after the crossover (Second intervention, 1: *L. reuteri* V3401; 2: placebo). (C) describes the Wilcoxon signed-rank test values and the significant levels by means of *p* and FDR *p*-values. FDR: False discovery rate; ♦: outliers data values.

4. Discussion

To the best of our knowledge, the PROSIR study is the first randomized, crossover clinical trial in humans that evaluates whether the strain *L. reuteri* V3401 is capable of improving the components

of MetS in humans when added to a healthy lifestyle. We did not find any differences in the clinical features of the syndrome between groups. This may be due to the fact that all subjects included in the study lost weight and improved their metabolic status as a result of the counseling to follow a healthy lifestyle that included diet and physical activity. However, we did find a decrease in IL-6 and sVCAM levels in patients who consumed the probiotic strain, together with a modification of the gastrointestinal microbiome, in particular, an increase in the *Verrucomicrobia* phylum.

Other studies have shown that consumption of *Lactobacillus casei* Shirota reduces sVCAM-1 levels in individuals who suffer from MetS, although in this study no effects on insulin sensitivity, endothelial function, or the inflammatory biomarkers were observed [26]. Bernini et al. [14] showed in another work that consumption of fermented milk enriched with *Bifidobacterium lactis* HN019 resulted in a reduction in BMI, an improvement in the lipid profile, and a significant decrease in proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6).

Systemic low-grade inflammation has an important role in the development of MetS. In this sense, IL-6 is a cytokine that has been associated with insulin resistance. Specifically, IL-6 is able to induce insulin resistance in both liver and adipocytes through reduction of phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS), or by transcription inhibition of the IRS [27,28]. In addition, adhesion molecules, such as sVCAM-1, are necessary for normal development and function of the heart and blood vessels, and they have been related to the development of CVD [29]. In the adult Spaniard population, impaired glucose metabolism has been related to increased levels of sVCAM-1 [30].

Results regarding the utility of probiotics in the treatment of MetS have been contradictory. This may be due to various facts: (i) the particular probiotic strain used in each trial; (ii) the experimental design—most of the studies have been parallel-group randomized trials, whereas a crossover study is a more appropriated approach to determine health benefits of clinical interventions; in crossover studies each participant serves as their own control, but in addition, this clinical design demands a lower sample size than parallel-group studies [21]; and (iii) the duration of the treatment. In our study, 12 weeks might not have been a long enough treatment to reverse, or at least improve, a chronic proinflammatory state as the one observed in MetS.

In recent years, it has become clear that the gut microbiota plays a role in the development of MetS. Specific bacterial groups have been described to be involved in obesity and related metabolic diseases. Among these bacteria, *Akkermansia muciniphila* has been proposed as a contributor to the maintenance of gut health and glucose homeostasis [31]. Administration of *A. muciniphila* to diet-induced obese animals improve their metabolic endotoxemia adipose tissue inflammation and insulin resistance [32]. It is worth mentioning that *Akkermansia* was the only genus of the *Verrucomicrobia* phylum present in the gastrointestinal samples [33]. In humans, *A. muciniphila* has been found to be decreased in prediabetic patients compared to normal glucose tolerance subjects [34]. Conversely, other studies have shown an increase of *A. muciniphila* in type 2 diabetes [35]. More recently, *A. muciniphila* has been reported to be associated with a healthy metabolic status in overweight and obese individuals, in agreement with previous results in murine studies [31]. Additionally, higher *A. muciniphila* abundance has been described in subjects with high bacterial gene richness, which is associated with a healthier metabolic status, in French and Danish population [8,31]. Although we found an increase in the proportion of the *Verrucomicrobia* phylum in the group that received the probiotic, we did not find any significant correlation between the delta proportions of *Verrucomicrobia* and any inflammatory biomarker.

It is important to highlight the age of the subjects that participated in our study. Our patients were younger compared to other previously published trials [14,15,36], and still we observed a decrease of inflammatory biomarkers and an increase in the abundance of *Verrucomicrobia* phylum in this pretreatment phase of the disease. This is consistent in both intervention periods, although in the case of gastrointestinal microbiome, the results only showed a trend in the second intervention, probably because of the dropout number we had, which is usual in large clinical intervention studies.

5. Conclusions

In conclusion, our data point to a beneficial effect of supplementation with *L. reuteri* V3401 in subjects with MetS when added to a hypocaloric diet and regular physical activity. In particular, these effects may be mediated by an improvement of dysbiosis and a decreased proinflammatory state, both features of this condition. However, further studies with longer periods of intervention are needed, in animals and clinical studies, to confirm these results and to elucidate the underlying mechanisms of action.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1761/s1>: Figure S1, Rarefaction curves; Figure S2, Alpha diversity measured by means of the Shannon index (H); Figure S3, Bacterial beta diversity; Table S1, Gastrointestinal microbiome normalized data.

Author Contributions: M.J.M.-R., M.O., Á.G. and C.G.-L. conceived and designed the study. C.T.-J., M.J.M.-R., I.D.C.-C., M.T.-L. and C.A.-I. were responsible for the clinical intervention and the follow-up of the patients, as part of the clinical team. J.P.-D., J.O., N.C. and F.G. performed the analysis. J.O., J.C., Á.G., C.T.-J., L.F. and C.G.-L. reviewed and did the statistics. C.T.-J. and C.G.-L. wrote the manuscript. L.F. revised the English and helped in writing the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This study is part of the grant entitled “Guía para la sustanciación de declaraciones de salud en alimentos: funciones inmune, cognitiva y síndrome metabólico”, funded by the company Biosearch life (Granada, Spain), reference 3006, managed by Fundación General Universidad de Granada, Spain.

Acknowledgments: This paper will be part of Carmen Tenorio Jimenez’s doctorate, which is being completed as part of Programa de Doctorado en Seguridad de los Alimentos at the University of Jaén, Spain. We also wish to thank all the participants who generously contributed to the study.

Conflicts of Interest: M.O. is Head of the Department of Research and Development at Biosearch Life. The funders had no role in the recruitment, biological sample analysis, statistical analysis, data interpretation, writing of the manuscript, nor in the decision to publish the results.

References

- Engin, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Results Probl. Cell Differ.* **2017**, *960*, 1–17.
- Fasshauer, M.; Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 461–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bäckhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L.V.; Koh, G.Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15718–15723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bäckhed, F.; Manchester, J.K.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 979–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zupancic, M.L.; Cantarel, B.L.; Liu, Z.; Drabek, E.F.; Ryan, K.A.; Cirimotich, S.; Jones, C.; Knight, R.; Walters, W.A.; Knights, D.; et al. Analysis of the gut microbiota in the older order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Turnbaugh, P.J.; Hamady, M.; Yatsunenko, T.; Cantarel, B.L.; Duncan, A.; Ley, R.E.; Sogin, M.L.; Jones, W.J.; Roe, B.A.; Affourtit, J.P. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **2009**, *457*, 480–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Le Chatelier, E.; MetaHIT Consortium; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.M.; et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546. [[CrossRef](#)]
- Cani, P.D.; Bibiloni, R.; Knauf, C.; Waget, A.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; Burcelin, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481. [[CrossRef](#)]
- Sanders, M.E. Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, S58–S61. [[CrossRef](#)]

11. Karczewski, J.; Troost, F.J.; Konings, L.; Dekker, J.; Kleerebezem, M.; Brummer, R.-J.M.; Wells, J.M. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2010**, *298*, G851–G859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Miglioranza Scavuzzi, B.; Miglioranza, L.H.; Henrique, F.C.; Pitelli Paroschi, T.; Lozovoy, M.A.; Simao, A.N.; Dichi, I. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1127–1138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ren, C.; Zhang, Q.; De Haan, B.J.; Zhang, H.; Faas, M.M.; De Vos, P. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34561. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bernini, L.J.; Simão, A.N.; Alfieri, D.F.; Lozovoy, M.A.; Mari, N.L.; de Souza, C.H.; Dichi, I.; Costa, G.N. 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*, 716–719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Barreto, F.M.; Simão, A.N.; Morimoto, H.K.; Lozovoy, M.A.; Dichi, I.; Miglioranza, H.D.S. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition* **2014**, *30*, 939–942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Sañudo Otero, A.L.; Criado García, R.; Rodríguez Nogales, A.; Garach Domech, A.; Olivares Martín, M.; Gálvez Peralta, J.J.; De La Escalera Hueso, S.; Duarte Pérez, J.M.; Zarzuelo Zurita, A.; Bañuelos Hortigüela, O. Probiotic Strains Having Cholesterol Absorbing Capacity, Methods and Uses Thereof. Google Patents No. EP3031930A1, 15 June 2016.
17. Tenorio-Jiménez, C.; Martínez-Ramírez, M.J.; Tercero-Lozano, M.; Arraiza-Irigoyen, C.; Del Castillo-Codes, I.; Olza, J.; Plaza-Díaz, J.; Fontana, L.; Migueles, J.H.; Olivares, M.; et al. Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation, cardiovascular risk and liver steatosis in obese adults with metabolic syndrome: A randomized clinical trial (PROSIR). *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 306. [\[CrossRef\]](#)
18. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *7*, e1. [\[CrossRef\]](#)
19. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *Peer J. Prepr.* **2018**, *6*, e27295v2.
20. Arteaga, F.; Ferrer, F. Dealing with missing data in MSPC: Several methods, different interpretations, some examples. *J. Chemom.* **2002**, *16*, 408–418. [\[CrossRef\]](#)
21. Wellek, S.; Blettner, M. On the proper use of the crossover design in clinical trials: Part 18 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2012**, *109*, 276–281. [\[CrossRef\]](#)
22. Bibby, J.; Kent, J.; Mardia, K. *Multivariate Analysis*; Academic Press: London, UK, 1979.
23. Barker, M.; Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **2003**, *17*, 166–173. [\[CrossRef\]](#)
24. Smilde, A.K.; Jansen, J.J.; Hoefsloot, H.C.; Lamers, R.J.; Van Der Greef, J.; Timmerman, M.E. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3043–3048. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Bokulich, N.A.; Dillon, M.R.; Zhang, Y.; Rideout, J.R.; Bolyen, E.; Li, H.; Albert, P.S.; Caporaso, J.G. q2-longitudinal: Longitudinal and Paired-Sample Analyses of Microbiome Data. *mSystems* **2018**, *3*, e00219-18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Tripolt, N.; Leber, B.; Blattl, D.; Eder, M.; Wonisch, W.; Schamag, H.; Stojakovic, T.; Obermayer-Pietsch, B.; Wascher, T.; Pieber, T.; et al. Short communication: Effect of supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota on insulin sensitivity, β -cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome—A pilot study. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 89–95. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Jaganathan, R.; Ravindran, R.; Dhanasekaran, S. Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Can. J. Diabetes* **2018**, *42*, 446–456.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Weigert, C.; Hennige, A.M.; Lehmann, R.; Brodbeck, K.; Baumgartner, F.; Schaüble, M.; Häring, H.U.; Schleicher, E.D. Direct Cross-talk of Interleukin-6 and Insulin Signal Transduction via Insulin Receptor Substrate-1 in Skeletal Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 7060–7067. [\[CrossRef\]](#)

29. Glowinska, B.; Urban, M.; Peczynska, J.; Florys, B.; Glowinska-Olszewska, B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism* **2005**, *54*, 1020–1026. [\[CrossRef\]](#)
30. Guzmán-Guzmán, I.P.; Zaragoza-García, O.; Vences-Valázquez, A.; Castro-Alarcón, N.; Muñoz-Valle, J.F.; Parra-Rojas, I. Circulating levels of MCP-1, VEGF-A, sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin and sVE-cadherin: Relationship with components of metabolic syndrome in young population. *Med. Clin. (Bar)* **2016**, *147*, 427–434. [\[CrossRef\]](#)
31. Dao, M.C.; Everard, A.; Aron-Wisnewsky, J.; Sokolovska, N.; Prifti, E.; Verger, E.O.; Kayser, B.D.; Levenez, F.; Chilloux, J.; Hoyles, L.; et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* **2016**, *65*, 426–436. [\[CrossRef\]](#)
32. Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J.P.; Druart, C.; Bindels, L.B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G.G.; Delzenne, N.M.; et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9066–9071. [\[CrossRef\]](#)
33. de Vos, W.M. Microbe profile: Akkermansia muciniphila: A conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology* **2017**, *163*, 646–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Zhang, X.; Shen, D.; Fang, Z.; Jie, Z.; Qiu, X.; Zhang, C.; Chen, Y.; Ji, L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS ONE* **2013**, *27*, e71108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Qin, J.; Li, Y.; Cai, Z.; Li, S.; Zhu, J.; Zhang, F.; Liang, S.; Zhang, W.; Guan, Y.; Shen, D.; et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **2012**, *490*, 55–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Stadlbauer, V.; Leber, B.; Lemesch, S.; Trajanoski, S.; Bashir, M.; Horvath, A.; Tawdrous, M.; Stojakovic, T.; Fauler, G.; Fickert, P.; et al. Lactobacillus casei Shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: A randomized pilot study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141399. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).