

Bruna Teles Soares Beserra

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SUA  
RELAÇÃO COM PARÂMETROS METABÓLICOS EM  
MULHERES COM OBESIDADE MÓRBIDA**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição, da Universidade Federal  
de Santa Catarina, para a obtenção  
do Grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Érasmo  
Benício Santos de Moraes  
Trindade

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Beserra, Bruna Teles Soares

Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida / Bruna Teles Soares Beserra ; orientador, Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade - Florianópolis, SC, 2014.  
109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. microbiota intestinal. 3. obesidade mórbida. 4. parâmetro glicêmico . 5. perfil lipídico. I. Trindade, Erasmo Benício Santos de Moraes . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Folha de aprovação



Dedico essa dissertação aos meus pais,  
por ser o meu exemplo de coragem,  
força e dedicação



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas infinitas graças concedidas e pela presença marcante em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Aurora, a mãe Neta e às minhas irmãs Mariana, Sibeles e Isadora, por todo amor. Cada um a sua maneira me transmitiu força, esteve presente e me apoiou, mostrando que eu sempre poderia ir mais longe. Esta conquista também é de vocês!

Ao meu namorado, Conrado, pelo amor, incentivo, apoio emocional e companheirismo, que foram imprescindíveis na reta final do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, meu orientador, toda minha gratidão e admiração. Obrigada por seus ensinamentos, apoio, dedicação, amizade e pelas palavras de incentivo. Foi um privilégio conviver com o senhor esses dois anos. Muito obrigada!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Martinello, pelos ensinamentos e pela dedicação para que esta dissertação fosse bem executada.

Aos meus colegas do grupo de orientação, Marilyn, Michel, Ricardo e Vinicius, pela amizade, pelas leituras e sugestões.

Aos meus colegas de Laboratório Gustavo e Rafael Vicenzi pela enorme ajuda nas análises laboratoriais.

A minha querida amiga Dani, pela amizade, por toda ajuda, pela força nos momentos mais difíceis desta etapa e por compartilhar dias e acontecimentos felizes.

A querida família, David, Sabrina e Maria Alejandra, por todo acolhimento, carinho e amizade.

Aos amigos Macell e Amanda Marreiro, pelo apoio, pela convivência, pela amizade e pelos agradáveis momentos que compartilhamos nesta jornada.

Aos vizinhos, Gustavo, Carla e Kátia, pelo apoio, incentivo, atenção e carinho.

A minha amiga Eva pelo incentivo constante, apoio e pelas conversas.

Às amigas pós-graduandas, Tábata, Camila, Morgana, Adriana, Thayz, Martha, Rafa, Amanda Giustina, pela amizade, vocês me proporcionaram momentos de descontração, aprendizado, troca de experiências e crescimento pessoal.

Aos amigos teresinenses Ana Raquel, Eleninha, Manu, Isaac, Raimundo Junior, Jéssica e Indhevysk pela amizade incondicional e preciosa.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, pela disponibilidade e confiança.

À equipe do Serviço de Análises Clínicas do HU/UFSC, pela coleta e realização dos exames.

À direção do HU/UFSC e a toda equipe interdisciplinar da cirurgia bariátrica, por terem proporcionado a realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN), pela oportunidade e ao corpo docente por promover o aprendizado e crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação de Mestrado.



“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

(Martin Luther King)



## RESUMO

**Introdução:** A microbiota intestinal refere-se aos micro-organismos que reside no trato gastrointestinal, sendo colonizada por bactérias que habitam permanentemente e temporariamente este órgão. Além dos fatores comumente envolvidos nas disfunções metabólicas presentes no indivíduo obeso, a microbiota intestinal pode estar relacionada com a patogênese e a progressão da obesidade. Na obesidade o acúmulo do tecido adiposo acarreta alterações na homeostase glicêmica e no perfil lipídico. Alterações dessas vias metabólicas pela obesidade podem estar relacionadas com a microbiota intestinal. **Objetivo:** Avaliar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, pH fecal e parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida e comparar com as mulheres eutróficas, como também associar as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* com os parâmetros metabólicos, em mulheres com obesidade mórbida. **Métodos:** Estudo transversal realizado em 19 mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório da cirurgia bariátrica e em 13 mulheres eutróficas. Foram realizadas coleta de fezes, para determinação dos gêneros *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal, coleta de sangue pra determinação dos parâmetros lipídicos e glicêmicos, coleta de dados clínicos e avaliação do estado nutricional. Para todos os testes estatísticos realizado, foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ . **Resultados:** As concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de estudo. As concentrações plasmáticas de HDL-c, VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR, apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo ( $p < 0,05$ ). Não houve associação das concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* com os parâmetros glicêmicos e lipídicos, em mulheres com obesidade mórbida. **Conclusão:** As concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* são similares nos grupos estudados, como também não houve associação dessas bactérias com os parâmetros metabólicos. Resultados esses com possível influência do período de acompanhamento e orientações nutricionais, que antecedem a indicação da cirurgia. Não obstante, o presente estudo confere subsídio para a continuidade de estudos longitudinais que avaliem intervenções. **Palavras-chave:** Microbiota intestinal; parâmetro glicêmico; perfil lipídico; obesidade mórbida.



## ABSTRACT

**Background:** The gut microbiota consists in the colony of microorganisms that reside in the gastrointestinal tract, being colonized by bacteria that inhabit permanently and temporarily this organ. In addition to the common factors involved in metabolic dysfunctions in obese individual, the gut microbiota may be related to the pathogenesis and progression of obesity. In obesity, the accumulation of adipose tissue leads to changes in glucose homeostasis and lipid profile. Abnormalities in these metabolic pathways triggered by obesity may be related to the gut microbiota. **Objectives:** Evaluate the concentrations of fecal *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., fecal pH and metabolic parameters in obese women and compared with non-obese women. Associate these concentrations of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp with metabolic parameters in women with morbid obesity. **Methods:** Cross-sectional study with 19 women with morbid obesity in preoperative bariatric surgery and 13 normal-weight women. Stool samples were collected to determine *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. and fecal pH, as well as blood samples for determination of lipid and glycemic parameters. Clinical data collection and evaluation of nutritional status were also performed. For all statistical tests performed, a significance level of  $p < 0.05$  was adopted. **Results:** Fecal concentrations of *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. and fecal pH were not significantly different between the study groups. Plasma concentrations of HDL-C, VLDL-C, triacylglycerol, glycated hemoglobin, insulin and HOMA-IR showed a significant difference between the study groups ( $p < 0.05$ ). There was no association between concentrations of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. with glycemic and lipid parameters in women with morbid obesity. **Conclusion:** The concentrations of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp are similar in the groups studied, there was also no association of these bacteria with metabolic parameters. These results with possible influence of the period of monitoring and nutritional guidelines, prior to surgical indication. Nevertheless, this study provides subsidy for the continuity of longitudinal studies to evaluate interventions. **Keywords:** Gut microbiota; glycemic parameters; lipid profile; morbid obesity.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Características do trato gastrointestinal humano.....	30
Figura 2 - Funções da microbiota intestinal sobre a regulação de energia.....	39





## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Taxonomia Bacteriana.....	27
Quadro 2- Estudos de associação entre microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes com excesso de peso.....	47
Quadro 3- Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal .....	60
Quadro 4 - Variáveis, suas características e indicadores utilizados para o modelo de análise.....	61



## LISTA DE ABREVIATURA

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
<b>ANGPTL4</b>	Angiopietina tipo 4
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>F6PPK</b>	Frutose-6-fosfatofosfocetolase
<b>FIAF</b>	Fator de adipócitos induzido por jejum
<b>GLP-1</b>	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
<b>GLP-2</b>	Peptídeo semelhante ao glucagon-2
<b>GPCRS</b>	Receptores acoplados a proteína g
<b>GPR41</b>	Receptores acoplados a proteína g 41
<b>GPR43</b>	Receptores acoplados a proteína g 43
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	Hemoglobina glicada
<b>HDL-c</b>	Lipoproteína de alta densidade-colesterol
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HOMA-IR</b>	Homeostases Model Assessment - Insulin Resistance
<b>HU/UFSC</b>	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IDL-c</b>	Lipoproteína de densidade intermediária-colesterol
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>LDL-c</b>	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
<b>LPL</b>	Lipoproteína lípase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
<b>POF</b>	Pesquisa de orçamento familiar
<b>PYY</b>	Peptídeo tirosina tirosina
<b>SCFA</b>	Ácido graxo de cadeia curta

<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TLR-4</b>	Receptor do tipo Toll 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônias
<b>VIGITEL</b>	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
<b>VLDL-c</b>	Lipoproteínas de densidade muito baixa-colesterol
<b>WHO</b>	World Health Organization

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
2.1 HIPÓTESES.....	25
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL .....	28
<b>2.1.1 Bifidobactérias.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.2 Lactobacilos.....</b>	<b>34</b>
2.2 OBESIDADE E MICROBIOTA INTESTINAL.....	36
<b>2.2.1 Parâmetros metabólicos associados com a obesidade e microbiota intestinal.....</b>	<b>41</b>
2.2.1.2 Parâmetros Glicêmicos.....	41
2.2.1.2 Parâmetros Lipídicos.....	43
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 GERAL.....	49
3.2 ESPECÍFICOS.....	49
<b>4 SUJEITOS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	51
4.2 AMOSTRA DE ESTUDO.....	51
4.3 PROTOCOLO DO ESTUDO.....	52
<b>4.3.1 Instrumentos e técnicas de coleta de dados.....</b>	<b>52</b>
4.3.1.1 Identificação dos indivíduos.....	52
4.3.1.2 Coleta do material fecal.....	53
4.3.1.3 Determinação do conteúdo de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> e pH fecal.....	53
4.3.1.3.1 Preparo do meio de cultura.....	53
4.3.1.3.2 Preparo do tampão.....	54
4.3.1.3.3 Processamento das amostras de fezes.....	54
4.3.1.3.4 Coloração de Gram.....	54
4.3.1.3.5 Prova da catalase.....	55
4.3.1.3.6 Identificação do gênero <i>Bifidobacterium spp.</i> por meio da reação F6PPK.....	55
4.3.1.4 Coleta do material sanguíneo.....	56
4.3.1.5 Determinação da insulina.....	56
4.3.1.6 Determinação da glicemia de jejum e hemoglobina glicada.....	57
4.3.1.7 Determinação da Resistência à insulina.....	58
4.3.1.8 Determinação do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos.....	58
4.3.1.9 Avaliação do estado nutricional.....	59

4.3.1.10	Parâmetros	clínicos	e
	demográficos.....		60
4.4	MODELO DE ANÁLISE.....		60
4.5	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....		62
4.6	PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....		62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>		<b>63</b>
5.1	MANUSCRITO.....		63
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>		<b>83</b>
<b>7</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>		<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>87</b>
	<b>APÊNDICE A</b>	<b>- Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE B</b>	<b>- Caracterização dos indivíduos.....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE C</b>	<b>- Avaliação da microbiota intestinal, laboratorial, antropométrica e parâmetros clínicos.....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE D</b>	<b>- Nota de Imprensa.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO A</b>	<b>- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal refere-se aos micro-organismos que reside no intestino dos animais, sendo composta por espécies nativas de bactérias que colonizam permanentemente o intestino além de um número variável de micro-organismos que podem temporariamente instalar-se neste órgão. Esta microbiota compreende trilhões de micro-organismos pertencentes principalmente aos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Enterobacter* (BRANDT; SAMPAIO; MUIKI, 2006; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A microbiota saudável é definida como aquela que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal. Em condições normais, exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro tais como: transformação de fibra dietética em açúcares simples, transformação de ácidos graxos de cadeia curta e de outros nutrientes para serem absorvidos; produção de vitamina K, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico; participação no metabolismo e recirculação de ácidos biliares; transformação de potenciais agentes carcinogênicos e ativação de compostos bioativos (DIBAISE et al., 2008).

A microbiota intestinal é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro, equilíbrio entre as necessidades e efeitos recíprocos. Quando em equilíbrio, esta microbiota impede que os micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos e se proliferem. Por outro lado, seu desequilíbrio pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Pesquisas mostram que a microbiota intestinal tem influência sobre o aparecimento e progressão de doenças humanas, tais como a obesidade, particularmente na regulação de energia e no armazenamento de gordura. Isso porque a microbiota intestinal participa na regulação do metabolismo da energia por vários mecanismos dentre eles: a absorção de energia a partir da dieta, a regulação do armazenamento de gordura, lipogênese e oxidação de ácidos graxos, modulação de hormônios peptídicos gastrointestinais aferentes e indução da endotoxemia metabólica (BACKHED et al., 2004; CANI; DELZENNE, 2009; TURBAUGH et al., 2006).

Os indivíduos com diagnóstico de obesidade têm alteração na microbiota intestinal em comparação com os indivíduos eutróficos,

caracterizada por diminuição da proporção dos filos Bacteroidetes/Firmicutes (LEY et al., 2006; JUMPERTZ et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que na obesidade o acúmulo de tecido adiposo leva à produção de citocinas pró-inflamatórias que causam inflamação e este quadro pode interferir em várias vias metabólicas do organismo, tais como a via de sinalização de insulina, alterando a homeostase glicêmica, que pode culminar com o desenvolvimento do diabetes tipo 2, bem como a alteração no perfil lipídico que pode resultar em dislipidemia (CONROY; DAVIDSON; WARNOCK, 2011; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

Alterações dessas vias metabólicas pela obesidade podem estar relacionadas com a microbiota intestinal. Estudos têm demonstrado que ratos *germ-free* são resistentes à obesidade induzida por dieta, os mecanismos metabólicos subjacentes a esta resistência incluem a diminuição da absorção de glicose, geração de ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal, redução da lipogênese hepática, aumento da oxidação de ácidos graxos e diminuição no depósito de triacilglicerol nos adipócitos (BACKHED et al., 2004; BACKHED et al., 2007; TURNBAUGH et al., 2006).

Além disso, a microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação e da resistência à insulina, quer pelo o seu papel na regulação da homeostase da energia e de armazenamento de gordura ou pela inflamação crônica que pode induzir, ou ambos (BANDT; DUPRIET; BUTEL, 2011).

Neste contexto, observa-se que a microbiota intestinal pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade, assim como nas desordens metabólicas associadas. Contudo, considerando o fato de que estudos que avaliaram a composição da microbiota intestinal de indivíduos com obesidade comparados com os indivíduos não obesos, ainda são controversos, como também se a composição da microbiota intestinal está ou não associada com os parâmetros metabólicos, propõe-se, portanto a realização desse estudo.



## 2.1 HIPÓTESES

As hipóteses do presente estudo são:

$H_0$  – As concentrações de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp.* não estão associadas com os parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida.

$H_1$  - As concentrações de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp.* estão associadas com os parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida .



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Foi realizada revisão bibliográfica sobre a temática “Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida” A pesquisa dos artigos foi feita nas bases de dados Pubmed, Scielo, Scopus e Web of Knowledge, no período de agosto de 2012 à junho de 2014. A busca de artigos sobre o tema envolveu as seguintes combinações dos descritores: microbiota intestinal ("gut microbiota" or "gut flora" or "gut microflora" or "gut microbiome" or "intestinal microbiota" or "intestinal flora" or "intestinal microflora" or "intestinal microbiome") x obesidade (obesity) x parâmetros glicêmicos (“blood glucose” or “glycated hemoglobin or insulin or HOMA-IR) x perfil lipídico (“very low density lipoprotein cholesterol” or VLDL or “low density lipoprotein cholesterol” or LDL or “high density lipoprotein cholesterol” or HDL or triglycerides)

O quadro 1 nos fornece informações sobre a taxonomia bacteriana citadas no presente estudo.

Quadro 1 - Taxonomia Bacteriana (continua)

Filo	Família	Gênero	Espécies
Firmicutes	Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>acidophilus, bulgaricus, brevis, casei crispatus, fermentum, gasseri Johnsonii, lactis, paracasei, plantarum, johnsonii, ruminis, salivarius reuteri e rhamnosus</i>
	Streptococcaceae	Streptococcus	<i>Agalactial, bovis, mutans, pneumoniae, pyogenes, salivarius, suis e viridans</i>
	Enterococcaceae	Enterococcus	<i>Faecalis, faecium, avium, galinarum, ramosus, casseliflavus e durans</i>
	Clostridiaceae	Clostridium	<i>Tetani, botulinum, perfringens e difficile</i>
	Enterobacteriaceae	Eubacterium	<i>Nodatum e oxidoreducens</i>
	Ruminococcaceae	Ruminococcus	<i>Albus, b e flavefaciens</i>
	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	<i>Magnus</i>

Quadro 1 – Taxonomia Bacteriana (conclusão)

Filo	Família	Gênero	Espécies
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	<i>Adolescentes, angulatum, animalis, bifidum, breve, catenulatum, dentium, infantis, pseudocatenulatum, lactis e longum</i>
	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	<i>Acnes, freudemeichii, propionicum</i>
Proteobacteria	Enterobacteria	Escherichia	<i>Albertii, blattal, coli, fergusonii, hermannii e hermannii</i>
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	Bacteroides	<i>Acidifaciens, gracilis, fragilis, vulgates, thetaiotaomicron, intestinalis e tectus</i>

## 2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

A terminologia microbiota refere-se a um conjunto de micro-organismos incluindo bactérias, arqueobactérias, vírus e alguns eucariotas unicelulares. Nos seres humanos, tem sido estimado que  $10^{14}$  UFC de micro-organismos habitem várias partes do corpo, tais como a superfície da pele e nos tratos gastrointestinal, geniturinário e respiratório (HARRIS et al., 2012).

Em relação à comunidade microbiana que habita o trato gastrointestinal, esta representa um grande ecossistema microbiano, com a presença de aproximadamente 400 espécies de filotipos. Cada órgão ou porção desse sistema diferencia-se quanto a sua anatomia e fisiologia o que resulta em um ambiente químico para o habitat de diferentes bactérias. A concentração de células microbianas no trato gastrointestinal aumenta consideravelmente do estômago para o colón (BLAUT; KLAUS, 2012; HARRIS et al., 2012).

No estômago há elevada produção de ácido, o qual é letal para a maioria dos micro-organismos, por isso, apenas dois gêneros são resistentes aos ácidos, os *Lactobacillus* e os *Streptococcus*, são predominantes. A bile e as secreções pancreáticas secretadas na porção superior do duodeno e do jejuno embora sejam tóxicas para a maioria dos micro-organismos, o número de bactérias aumenta progressivamente até  $10^7$  células/mL no íleo distal. O maior número de bactérias reside no intestino grosso, órgão este que abriga uma comunidade microbiana complexa e densa composta principalmente de

espécies anaeróbias (Figura 1) (ARON-WISNEWSKY; DORÉ; CLEMENT, 2012).

O ambiente do cólon é favorável para o crescimento bacteriano devido a diminuição do trânsito, nutrientes disponíveis e pH favorável (5,7 – 6,8). Geralmente, as bactérias que têm metabolismo sacarolítico quase exclusivo, ou seja, sem atividade proteolítica, podem ser consideradas como potencialmente benéficas. Este perfil metabólico é observado nas bactérias que pertencem ao gênero lactobacilos e bifidobactérias (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991).

A maioria dos micro-organismos que habita a microbiota intestinal pertence aos filos Firmicutes (79,4%), Bacteroidetes (16,9%), Actinobacteria (2,5%) e Proteobacteria (1%), Verrucomicrobia (0,1%). Fungos e Archaea também estão presentes, mas compreendem menos de 1% do total de micro-organismos (TAP et al., 2009; HARRIS et al., 2012).

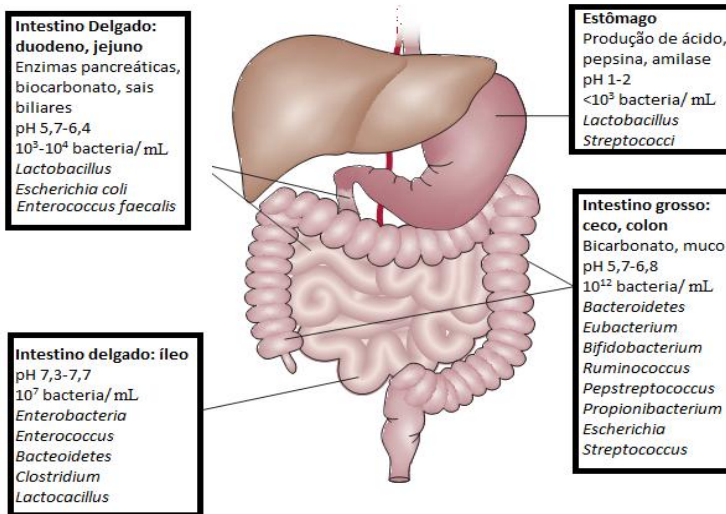
É oportuno destacar que a elevada variabilidade interindividual na composição da microbiota intestinal torna difícil definir um núcleo microbiome (todos os membros de um ecossistema microbiano) que seja compartilhado por todos os seres humanos. Embora as espécies que compõem a microbiota intestinal de seres humanos possam variar em algumas circunstâncias, por exemplo, doenças diarréicas agudas, antibioticoterapia e intervenções dietéticas, a proporção de bactérias na microbiota intestinal permanece constante (GUARNER; MALAGELADA, 2003; BLAUT; KLAUS, 2012).

O processo de colonização do trato gastrointestinal está relacionado com a capacidade de aderência das bactérias nos receptores de adesão da mucosa intestinal. As bactérias autóctones habitam permanentemente o trato gastrointestinal, com exemplos as bifidobactérias e os lactobacilos, enquanto que as bactérias alóctones habitam temporariamente, uma vez que não possuem uma adequada adesão à mucosa gastrointestinal (BRANDT; SAMPAIO; MUIKI, 2006).

Com relação ao processo de colonização inicial da microbiota intestinal, destaca-se que no nascimento, os seres humanos são essencialmente livres de bactérias e o processo de colonização inicia depois do parto e continua até o período adulto. A microbiota inicial é caracterizada por baixa diversidade e constituída principalmente por bactérias anaeróbias facultativas pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Esta microbiota torna-se mais diversa, e as bactérias que pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes passam a ser dominantes. Desta forma, a colonização inicial é importante para a composição da

microbiota intestinal na fase adulta (CARLISLE; MOROWITZ, 2010; BACKHED, 2011).

Figura 1 - Características do trato gastrointestinal humano.



Cada órgão ou porção do trato gastrointestinal diferencia-se quanto a sua anatomia e fisiologia o que resulta em um ambiente químico para o habitat de diferentes bactérias. As concentrações de células bacterianas aumentam consideravelmente do estômago para o colón. Fonte: Adaptado de Aron-Wisniewsky, Doré e Clement (2012).

Entretanto, alguns fatores podem influenciar neste processo de colonização, como: a microbiota materna, dieta (aleitamento materno ou fórmula infantil); tipo de parto (normal ou cesariana); tempo de gestação (termo ou pré-termo). A composição da microbiota intestinal é também influenciada por intervenções clínicas e cirúrgicas e por vários fatores ambientais, incluindo o uso de antibióticos, estilo de vida, dieta e hábitos de higiene. Além disso, estudo recente demonstrou relação direta entre o sistema sanguíneo ABO e a microbiota intestinal. Nesse estudo, o grupo O apresentou maior concentração de *Bifidobacterium spp.*, o grupo AB maior concentração de *Bacteroides fragilis* e o grupo B maior concentração de *Lactobacillus spp.* (MARCHESI, 2011; MAKIVUOKKO et al., 2012; SOMMER; BACKHED, 2013).

De acordo com dados experimentais é possível identificar três funções principais da microbiota intestinal: 1) Função de metabolismo, como resultado da atividade bioquímica da microbiota, formação dos ácidos graxos de cadeia curta, acetato, propionato e butirato, produção das vitaminas K e B<sub>12</sub> e efeitos favoráveis sobre a absorção de cálcio e ferro no cólon; 2) função de proteção, impedindo invasão por agentes infecciosos ou crescimento de micro-organismo com potencial patogênico; e 3) função trófica, sobre a proliferação e diferenciação do epitélio intestinal, e desenvolvimento do sistema de modulação imune (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Uma importante função metabólica da microbiota intestinal é a fermentação que acontece no cólon. Os principais substratos que participam desse processo são endógenos, como por exemplo, o muco, e os hidratos de carbono dietéticos que não são digeridos no trato gastrointestinal superior, e incluem o amido resistente, polissacarídeos, oligossacarídeos e alcoóis de açúcar. Adicionalmente, os componentes dietéticos que estimulam a fermentação favorecem o aumento da massa bacteriana e consequentemente da massa fecal, promovendo aumento do volume das fezes. Estima-se que cerca de 30 g de bactérias são produzidos para cada 100 g de hidratos de carbono fermentados (SLAVIN, 2013).

No processo de fermentação, as bactérias do cólon utilizam uma variedade de enzimas de hidrólise de hidratos de carbono para produzir hidrogênio, metano, dióxido de carbono, lactato, e ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato. Esses ácidos graxos exercem papel fundamental na fisiologia do cólon, uma vez que, eles constituem a principal fonte de energia para os enterócitos e colonócitos, estimulam a proliferação celular do epitélio e do fluxo sanguíneo visceral, e intensificam a absorção de sódio e água, reduzindo a carga osmótica do carboidrato (ALMEIDA et al., 2009).

Vale destacar que a fermentação e a produção de ácido graxo de cadeia curta, inibem o crescimento bactérias patogênicas, por meio da redução do pH luminal e fecal. Um pH baixo reduz a degradação de péptido e a formação de compostos tóxicos, tais como: amoníaco, aminas, e os compostos fenólicos, como também diminui a atividade das enzimas bacterianas indesejáveis (SLAVIN, 2013).

Em relação à função de proteção, a microbiota intestinal desempenha papel de proteção direta, por meio de barreira física formada por componentes celulares do endotélio vascular e por células epiteliais. Sob condições normais, os micro-organismos anaeróbicos residentes no cólon crescem formando uma camada sob a superfície da

parede intestinal limitando a colonização e crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos (BOURLIOUX et al., 2003).

Em relação à função trófica, esta é desempenhada por competição, principalmente pelos ácidos graxos de cadeia curta, que participam do crescimento e diferenciação do epitélio celular, desempenhando ações fisiológicas importantes na regulação hepática de gorduras e açúcares e servindo de substrato energético para os colonócitos (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Dentre os ácidos graxos de cadeia curta que desempenham a função trófica destaca-se o butirato. Ele é o combustível preferido das células epiteliais do cólon e desempenha um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação celular, como também esse ácido estimula a imunogenicidade das células cancerosas. O butirato exerce uma atividade antiproliferativa em muitos tipos de células, e há estudos que demonstraram efeitos preventivos do butirato no desenvolvimento do câncer de cólon e de adenoma (WONG et al., 2006)

Adicionalmente, a microbiota intestinal funciona como barreira imunológica do corpo humano. No nascimento, o sistema imunológico é imaturo e se desenvolve após colonização da microbiota intestinal. Esta microbiota por sua vez, estimula o aumento do número de placas de Peyer, liberação de imunoglobulinas (especialmente a imunoglobulina A secretora), reconhecimento das células dendríticas e coordena sinais pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (TAPPENDEN; DEUTSCH, 2007).

Portanto, a microbiota intestinal é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro. Algumas bactérias que compõem esta microbiota são sempre benéficas, não patogênicas e protetoras da mucosa intestinal, como as bifidobactérias e os lactobacilos, enquanto outras podem desempenhar tanto efeitos patogênico, quanto efeitos benéficos ao hospedeiro, como exemplo os bacteroides (BRANDT; SAMPAIO; MUIUKI, 2006; GIBSON; ROBERFROID, 1995).

### **2.1.1 Bifidobactérias**

O gênero *Bifidobacterium* pertencente ao grupo dominantes do micro-organismos anaeróbicos da microbiota intestinal (VOROBEVA, 2005). O pH ótimo para o crescimento do *Bifidobacterium* é 6,0-7,0, com nenhum crescimento a pH 4,5-5,0 ou a pH 8,0-8,5 e acima. Crescimento ótimo ocorre a uma temperatura de 37-41°C, as



temperaturas mínimas e máximas de crescimento são 25-28 e 43-45°C, respectivamente (SHAH, 2007).

O gênero *Bifidobacterium*, pertence ao filo e classe Actinobacteria, da ordem Bifidobacteriales e é um membro da família Bifidobacteriaceae, representando uma das maiores unidades taxonômicas bacterianas. As bifidobactérias são micro-organismos Gram-positivos, catalase negativa, anaeróbios estritos, que habitam naturalmente o trato gastrointestinal dos humanos. Não possuem motilidade, não formam esporos. No que diz respeito a sua morfologia, podem apresentar várias formas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos com extremidade em forma de V ou Y (TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011).

Existem 29 espécies do gênero *Bifidobacterium*, das quais 14 foram isoladas a partir fontes humanas (microbiota oral, intestinal e vaginal), 12 a partir do trato intestinal ou do rúmen de animais, e 3 a partir de abelhas. As espécies *Bifidobacterium* encontradas em seres humanos são: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. pseudocatenulatum*. Sendo que as espécies *B. breve*, *B. infantis*, e *B. longum* são encontradas em recém-nascidos e as espécies *B. adolescentis*, e *B. longum* são encontradas em adultos (SHAH, 2007).

Essas bactérias são heterofermentativas, produzindo o ácido acético e lático na proporção molar de 3:2, a partir de dois moles de hexose, sem produção de CO<sub>2</sub>, exceto durante a degradação do gluconato. As bifidobactérias não possuem a enzima aldolase e apresentam atividade reduzida da fosfofrutoquinase, metabolizando a glicose por um processo diferenciado. A enzima-chave desta via fermentativa é a frutose-6-fosfatofosfocetolase (F6PPK), que está envolvida na quebra da frutose-6-fosfato para eritrose-4-fosfato e acetil-fosfato, na presença de fosfato inorgânico e tem sido utilizada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies (POKUSAEVA; FITZGERALD; SINDEREN, 2011).

O processo de fermentação pelas bifidobactérias ocorre por diferentes fontes de carbono complexo, tais como a mucina gástrica, xilo-oligossacarídeos, (trans)-galacto, oligossacarídeos de soja, malto-oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos, pectina e lactose, embora a capacidade de metabolizar os hidratos de carbono específicos da espécie seja dependente da cepa (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

As bifidobactérias possuem vários efeitos de promoção à saúde, tais como, manutenção da microbiota intestinal após terapia

antimicrobiana, redução do colesterol sérico por meio da degradação e absorção dos ácidos biliares, ação que também contribui para redução da secreção de mucina e fluidos que contribuem para o desenvolvimento de diarreia ou síndrome do intestino irritável. Também possuem atividade imunomoduladora, melhorando a resistência aos patógenos e a atividade antitumoral (VAN DEN BROEK et al., 2008; CAMILLERI, 2006).

No estudo de Cani et al. (2007), realizado em camundongos, mostrou que as concentrações de bifidobactérias correlacionaram-se inversamente com o desenvolvimento da massa de gordura, intolerância à glicose e concentrações de lipossacarídeos. Em outra pesquisa realizada por Riedel et al. (2006) mostrou que algumas cepas de bifidobactérias reduzem as concentrações de lipossacarídeos, por meio da inibição do fator nuclear kappa B e esta inibição foi associada com a diminuição das concentrações de interleucina 8 e fator de necrose tumoral.

As bifidobactérias residentes no intestino humano têm sido objeto de interesse de estudo devido suas potenciais propriedades probióticas. Algumas espécies de bifidobactérias que possuem atividades probiótica tornaram-se economicamente importantes e são adicionadas como bactérias vivas nas preparações de alimentos funcionais, o que acarreta em efeitos benéficos à saúde, tais como diminuição do colesterol total, atividade antitumoral e manutenção da microbiota intestinal (TURRONIN; SINDEREN; VENTURA, 2011).

Como mencionado anteriormente, o crescimento e a atividade metabólica das bifidobactérias podem ser seletivamente estimulados por hidratos de carbono não digeríveis, denominado prebióticos (POKUSAIEVA; FITZGERALD; SINDEREN, 2011).

### 2.1.2 Lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes e classe dos Bacilos, e é membro da ordem Lactobacillales, da família Lactobacillaceae. Os lactobacilos são bastonetes Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, não móveis, não formadores de esporos, catalase negativos e pertencentes ao grupo das bactérias de ácido láctico (BERNARDEAU et al., 2008).

Os lactobacilos estão presentes na dieta e ao longo do trato gastrointestinal. Sendo sua concentração aproximada na cavidade oral de  $10^3$  -  $10^4$  UFC/g, no íleo de  $10^3$  -  $10^7$  UFC/g e no cólon de  $10^4$  -  $10^8$

UFC/g. Por causa do seu metabolismo, os lactobacilos estão entre as bactérias dominantes do intestino delgado proximal, no duodeno e jejuno, onde os substratos ricos em carboidratos são facilmente encontrados e utilizados por estas bactérias como fonte primária de nutrientes (VÉLEZ; KEERSMAECKER; VANDERLEYDEN, 2007; BERNARDEAU et al., 2008).

Pelo menos 70 espécies de Lactobacilos já foram descritas. Sendo que, as espécies com maiores concentrações nas fezes humanas são *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus reuteri* enquanto que as espécies em menores concentrações são *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus brevis*. Entretanto, análises da microbiota intestinal humana, utilizando metodologias moleculares para diferenciação e identificação de lactobacilos, têm demonstrado, presença das bactérias pertencentes às espécies *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. ruminis*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* em concentrações elevadas nas fezes humanas (TANNOCK, 2002).

As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* crescem em temperaturas que variam de 2 a 53 °C, com valores ótimos geralmente de 30 a 40 °C. São acidúricas, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 sendo que o crescimento pode ocorrer em pH 5,0 ou menor. O crescimento é frequentemente reduzido em meios neutros ou alcalinos (MACEDO et al., 2008).

Os lactobacilos são classificados em três grupos de acordo com a sua característica de fermentação: homofermentativos obrigatórios, que fermentam hexoses em ácido láctico; heterofermentativos facultativos, que fermentam hexoses em ácido láctico somente ou ácido láctico junto com ácido acético, etanol e ácido fórmico sob limitação de glicose; e os heterofermentativos obrigatórios, que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub> e pentoses em ácido láctico e ácido acético (CLAESSON; SINDEREN; O'TOOLE, 2007).

Os lactobacilos são importantes para a prevenção e tratamento de doenças humanas, pois promovem a regulação da microbiota intestinal, desempenhando atividade antimicrobiana, promove melhora no metabolismo da lactose, possuem propriedades antimutagênica e anticancerígenas, reduzem concentrações de colesterol sérico, reduzem a carga bacteriana em doentes infectados por *Helicobacter pylori*, estimulam o sistema imunitário e são utilizados no tratamento da doença inflamatória intestinal e infecções gastrointestinais, destacando-se a eficácia no tratamento da diarreia (SHAH, 2007).

Os lactobacilos são de suma importância para as indústrias de alimentos, devido ao seu envolvimento na produção de diversos produtos fermentados lácteos, carnes e alimentos de origem vegetal. Como também são utilizados como probióticos devido ao seu efeito de promoção à saúde, principalmente devido seu papel de adesão ao intestino do hospedeiro, o que se presume ser necessária para conferir benefícios à saúde (TASSELL; MILLER, 2011).

No estudo realizado por Ejtahed et al. (2011), foi observado que os indivíduos diabéticos tipo 2 que receberam iorgute probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, tiveram redução de 4,54% de colesterol total e uma redução de 7,45% das concentrações de LDL-c, quando comparados com o grupo placebo que receberam iorgute convencional. Em outro estudo realizado por Savard et al. (2011), foi verificado o impacto do consumo de um iorgute comercial contendo *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* e *Lactobacillus acidophilus* na contagem de bactérias fecais, o estudo mostrou um crescimento de bactérias benéficas e uma redução de bactérias potencialmente patogênicas.

## 2.2 OBESIDADE E MICROBIOTA INTESTINAL

A obesidade é definida como uma doença crônica de natureza multifatorial, dentre os quais se destacam fatores ambientais, nutricionais e genéticos, e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, acarretando prejuízos à saúde (BRASIL, 2007). Segundo a *World Health Organization* (WHO) a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, representando um problema de abrangência mundial (WHO, 2000a). Em 2008, 10% dos homens e 14% das mulheres no mundo estavam obesos, em comparação com 5% dos homens e 8% das mulheres em 1980 (WHO, 2012).

No Brasil, a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009) mostrou um aumento do peso da população em todas as regiões do país. Neste período, 49% da população brasileira adulta apresentavam excesso de peso e a obesidade esteve presente em 14,8% dos indivíduos. Ainda de acordo com esta pesquisa, a prevalência de obesidade na Região Sul do país foi de 15,9% para os homens e 19,6% para as mulheres (IBGE, 2011). Corroborando com estes achados, dados do último Estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para

Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) revelaram que 15,8% da população brasileira, com 18 anos ou mais, apresentava obesidade no ano de 2011 (VIGITEL, 2012).

A obesidade dentre outras situações de doenças (a diarreia associada a antibióticos, sepse por translocação bacteriana, doença inflamatória intestinal e doença autoimune) já foram associadas a alterações da composição da microbiota intestinal, caracterizando assim um quadro de disbiose. A disbiose é definida como um estado em que a microbiota intestinal produz efeitos nocivos por meio de: mudanças qualitativas e quantitativas das bactérias, mudanças no metabolismo delas e mudanças na distribuição das bactérias (ALONSO; GUARNER, 2013; HAWRELAK; MYERS, 2004).

Alterações na fisiologia intestinal têm como consequência o desequilíbrio da microbiota intestinal, desencadeando aumento de bactérias patogênicas, configurando situação de risco. Algumas destas bactérias podem colonizar o intestino delgado, com consequências graves como prejuízo da função digestiva e a combinação de toxinas com proteínas. Este processo é chamado de disbiose, um distúrbio cada vez mais considerado no diagnóstico de várias doenças e caracterizado por uma disfunção colônica devido à alteração da microbiota intestinal, na qual ocorre predomínio das bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas (ALMEIDA et al., 2009; ALONSO; GUARNER, 2013).

A microbiota intestinal pode regular o armazenamento de energia por vários mecanismos dentre eles: aumento da absorção de monossacarídeos, por absorção de energia a partir de componentes alimentares não digeríveis via ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação, aumento da lipogênese hepática, supressão do fator de adipócitos induzido por jejum (FIJF) que aumenta a atividade da enzima lipoproteína lipase, inibição da oxidação de ácidos graxos da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e agindo nos ácidos graxos de cadeia curta por meio dos receptores acoplados a proteína G 41 (Figura 2) (CANI; DELZENNE, 2009).

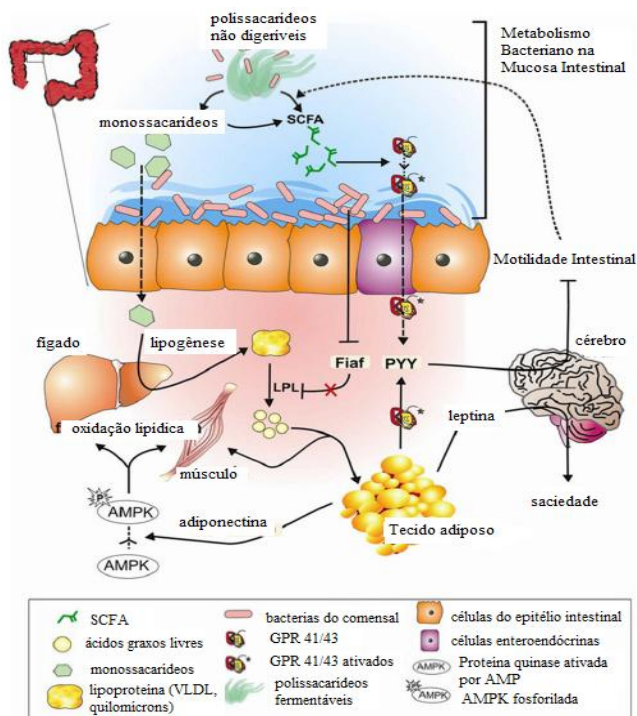
Evidências sobre o papel da microbiota intestinal na absorção de energia pela dieta vieram de estudos realizados em ratos *germ-free*. Backhed et al. (2004) observaram que em ratos *germ-free* quando colonizados com a microbiota intestinal saudável de ratos convencionais, aumentaram 60% em gordura corporal, após 14 dias de colonização, apesar da redução da ingestão alimentar. No estudo realizado por Backhed et al. (2007) verificou-se que o aumento do AMPK preveniu, nos animais *germ-free*, a obesidade induzida pela dieta com alto teor de gordura e carboidratos.

Nestes estudos também foi verificado que o aumento da produção de triacilglicerol no fígado, depois da colonização intestinal nos ratos *germ-free*, foi associado com a redução da expressão da angiopoietina tipo 4 (ANGPTL4). ANGPTL4 é um potente inibidor da enzima lipoproteína lipase, que medeia a absorção celular de triacilglicerol. Camundongos *germ-free* com deficiência de ANGPTL4 ganharam massa gorda e peso corporal durante uma alimentação rica em gordura, após serem colonizados, indicando que ANGPTL4 medeia diretamente à regulação microbiana da adiposidade em camundongos (BACKHED et al., 2004; BACKHED et al., 2007).

Deve-se destacar que os adipócitos desempenham papel importante na obesidade, por liberar os hormônios leptina e adiponectina. Adiponectina está associada com AMPK, enzima que monitora o *status* de energia celular e estimula a oxidação de ácidos graxos nos tecidos periféricos. Na obesidade, a concentração de adiponectina encontra-se diminuída, causando desativação da AMPK e promovendo a diminuição da oxidação dos ácidos graxos e um aumento do influxo dos ácidos graxos livres para o fígado (SKURK et al., 2007; YAMAUCHI et al., 2002)

Ainda em relação ao estudo Backhed et al. (2007), os autores observaram em camundongos que foram colonizados com *Bacteroides thetaiotaomicron* aumento da gordura corporal por causa da supressão bacteriana do FIAF. Desta forma, o balanço de energia também está associado ao FIAF; redução da expressão FIAF induz a atividade da lipoproteína lipase (LPL), enzima responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres (AGL). A distribuição dos ácidos graxos livres armazenados não é bem conhecida, entretanto uma alta concentração de tecido adiposo direciona mais AGL para os tecidos adiposos, enquanto que uma baixa concentração induz o armazenamento de AGL nos músculos. A expansão do tecido adiposo, por sua vez, resulta numa incapacidade de armazenar excedentes de AGL, o que aumenta as concentrações séricas de AGL (KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012).

Figura 2 - Funções da microbiota intestinal sobre a regulação de energia



Ao quebrar polissacarídeos não digeríveis, os microorganismos do intestino produzem monossacarídeos e SCFAs. Os SCFAs ligam a GPR 41/43 receptores e estimula a produção de PYY, o que inibe a motilidade intestinal e permite que as bactérias do intestino possam digerir mais polissacarídeos. As bactérias intestinais também regulam o metabolismo energético, reduzindo a expressão do FIAF a partir de células epiteliais do intestino. O FIAF suprime a degradação de lipoproteínas e deposição de SCFAs no tecido adiposo. A adiposidade nos músculos esqueléticos e no fígado também é regulada por microorganismos através das mudanças do AMPK. AMPK, proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; SCFA, ácido graxo de cadeia curta; GPR 41/43, receptores acoplados a proteína G41/43; PYY, peptídeo tirosina tirosina; FIAF, fator de adipócito induzido por jejum; LPL, lipoproteína lipase; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade.

Fonte: Adaptado por Krajmalnik-Brown et al., 2012.

Com relação aos ácidos graxos de cadeia curta, eles podem regular a expressão de gene por meio da ligação dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), como o receptores acoplados a

proteína G 43 (GPR43) e o receptores acoplados a proteína G 41 (GPR41). A sinalização por meio destes receptores afeta várias funções diferentes, dependendo do tipo celular. GPR43 modula a secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), que é produzido pelas células L do intestino delgado distal e pelo colón, a liberação do GLP-1 estimula a secreção da insulina e a proliferação das células  $\beta$  pancreáticas. Como também, a microbiota intestinal induz a expressão do peptídeo tirosina tirosina (PYY), que também é produzido pelas células L do intestino delgado distal e pelo colón, por meio de um mecanismo GPR41 dependente. O PYY inibe a secreção gástrica e pancreática, o esvaziamento gástrico e estimula o transporte de nutrientes (TREMAROLI; BACKHED, 2012).

No estudo realizado por Samuel et al. (2008), verificou-se que os camundongos convencionais deficientes em GPR41 reduziram a adiposidade em comparação com camundongos convencionais do tipo selvagem, enquanto que os camundongos *germ-free* tipo selvagem e deficientes em GPR41 tinham adiposidade semelhantes, mostrando que o efeito da microbiota intestinal na deposição de gordura é dependente do receptor dos ácidos graxos de cadeia curta .

Além disso, esta microbiota intestinal também pode estar envolvida no desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau, relacionada com a obesidade. Como já citado anteriormente, dieta rica em gordura promove mudanças na composição da microbiota intestinal, como exemplo a diminuição da concentração de *Bifidobacterium spp.*, fenômeno este que promove aumento da permeabilidade intestinal, aumentando assim, a endotoxemia metabólica e desencadeando o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, dentre eles, resistência à insulina, diabetes e infiltração de macrófagos no tecido adiposo (CANI; DELZENNE, 2009).

Visando promover a diminuição da endotoxemia metabólica e o desenvolvimento de doenças metabólicas, estudo realizado por Cani et al. (2009) observou em seu experimento com camundongos, que a modulação da microbiota intestinal aumenta a produção endógena de peptídeo semelhante ao glucagon-2 (GLP-2) e, conseqüentemente, melhora a função de barreira do intestino por um mecanismo de GLP-2 dependente, promovendo assim a diminuição destes eventos

Alguns estudos têm avaliado a diferença da composição da microbiota intestinal entre indivíduos obesos e indivíduos eutróficos. Estudo realizado por Turnbaugh et al. (2009) verificou uma diminuição das concentrações de bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes e um aumento das concentrações de bactérias pertencente ao filo



Actinobacteria em indivíduos obesos, quando comparados com indivíduos eutróficos. Entretanto não se observou diferença nas concentrações de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes. No estudo de Ley et al. (2006), indivíduos obesos apresentaram menor concentração do filo Bacteroidetes e maior concentração do filo Firmicutes. Houve também uma correlação positiva entre as concentrações de Bacteroidetes e a perda de peso ( $R^2 = 0,8$ ;  $P < 0,05$ ).

Por outro lado, Duncan et al. (2008) não observaram diferenças entre as concentrações de Bacteroidetes quando se compararam os indivíduos obesos com os indivíduos eutróficos. Jumpertz et al. (2011) demonstraram que o aumento da ingestão de calorias, promove mudanças rápidas na microbiota intestinal, tanto nos indivíduos obeso, quanto nos indivíduos eutróficos, promovendo aumento nas concentrações das bactérias pertencentes ao filo Firmicutes e uma diminuição das bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes.

Zuo et al. (2011) observaram que as bactérias pertencentes ao gênero Bacteroides foram encontradas em maiores concentrações nos indivíduos eutróficos ( $10,06 \pm 0,39 \text{ Log}_{10}$ ) quando comparadas a indivíduos obesos ( $9,81 \pm 0,58 \text{ Log}_{10}$ ). Em relação às bifidobactérias e os lactobacilos, não foi verificada diferença entre os grupos. Ressalta-se que os estudos realizados por Turnbaugh et al. (2009), Ley et al. (2006), Duncan et al. (2008), Jumpertz et al. (2011) e Zuo et al. (2011), utilizaram técnicas moleculares pra a determinação de filios e gêneros bacterianos.

Destaca-se que a obesidade por se tratar de uma condição crônica e de etiologia multifatorial, o tratamento dessa doença emprega várias abordagens, dentre elas, a terapia não farmacológica (dieta, atividade física, modificação comportamental e envolvimento familiar), farmacológica e cirúrgica. Nos casos de obesidade grave com falha de tratamento clínico, a cirurgia bariátrica é um recurso terapêutico consistente, proporcionando redução nos índices de mortalidade e melhora de comorbidades clínicas, como desordens cardiovasculares, endocrinológicas, infecciosas, psiquiátricas e cânceres (ABESO, 2009).

## **2.2.1 Parâmetros metabólicos associados com a obesidade e microbiota intestinal**

### **2.2.1.2 Parâmetros glicêmicos**

Estudos têm demonstrado que os ratos *germ-free* são protegidos contra as desordens metabólicas associadas à obesidade, incluindo a intolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. A colonização de ratos *germ-free* com microbiota intestinal leva aumento de 60% na gordura corporal total, promovendo maior capacidade para armazenar energia da dieta e diminuição da sensibilidade à insulina (RABOT et al., 2010; DIAMANT; BLAAK; VOS, 2011). Backhed et al. (2007) concluíram em seus experimentos que a microbiota intestinal predis põe o hospedeiro à obesidade e resistência à insulina, em parte, pela diminuição da atividade da AMPK e oxidação de ácidos graxos nos tecidos periféricos.

A microbiota intestinal esta relacionada às desordens metabólicas por meio de sinais inflamatórios endógenos relacionados com variações específicas na composição da flora bacteriana. Assim, a produção de citocinas inflamatórias, desencadeada pela microbiota intestinal, pode estar envolvida na inflamação sistêmica crônica que conduz a obesidade e a resistência à insulina (BANDT; DUPRIET; BUTEL, 2011). Estudo realizado por Haub et al. (2010) mostrou que a endotoxemia foi associada a distúrbios metabólicos característicos da resistência à insulina, como o aumento da glicemia de jejum e insulina plasmática.

Vários compostos derivados de micro-organismos estão relacionados com alterações da homeostase da glicose dentre eles, os lipopolissacarídeo (LPS), que são derivados da parede celular de bactérias gram-negativas. O LPS favorece a ocorrência da hiperglicemia e resistência à insulina, devido ao impacto da dieta rica em gordura (DELZENNE; CANI, 2011). Pesquisas mostram que as concentrações de LPS estão associadas significativamente com a insulina e glicemia de jejum (BASU et al., 2011; CREELY et al., 2007; SUN et al., 2010).

Ressalta-se que o LPS pode desencadear um processo inflamatório por meio da sua ligação ao complexo CD14 *toll-like receptor-4* (TLR-4) na superfície das células imunitárias inatas. A relevância das vias TLR-4 para doença metabólica foi confirmada pela descoberta de que a supressão do TLR-4 impediu a resistência à insulina em dieta com elevado teor de gordura. Isso ocorre pelo fato que a ativação da sinalização do TLR4 induz aumento da expressão de vias inflamatórias relacionadas com a indução da resistência à insulina (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2010; CARICILLI; SAAD, 2013).

A microbiota intestinal também pode modular a glicemia por outros processos. Alguns dados experimentais, que comparam o comportamento metabólico de animais convencionais e *germ-free*,

sugerem que a microbiota intestinal melhora a digestão e a absorção dos nutrientes ingeridos, ou seja, promova à absorção intestinal de monossacarídeos, e isto contribui para aumento na glicemia pós-prandial (BACKHED et al., 2004).

Além disso, como já descrito anteriormente, os principais produtos finais da fermentação de bactérias são os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Os SCFA são ligados aos receptores acoplados à proteína (GPCRs), a Gpr41 e Gpr43. Estes receptores são expressos em células epiteliais, no sistema endócrino e nos adipócitos. A inativação do GPR43 está associada com menor massa de gordura corporal, diminuição da resistência à insulina, maior gasto energético e aumento da ingestão de alimentos (ESTEVE; RICART; REAL, 2011).

Destaca-se que o papel da microbiota intestinal na resistência à insulina de seres humanos obesos foi demonstrado por transferência da microbiota intestinal de indivíduos magros saudáveis para indivíduos obesos resistentes à insulina. Após remover a microbiota endógena dos obesos resistentes à insulina por lavagem intestinal, os pesquisadores distribuíram os voluntários a um grupo de infusão alogênica, que foi infundido no intestino delgado a microbiota fecal de indivíduos magros saudáveis correspondendo com a idade e o sexo, ou para um grupo de infusão autóloga, que foram re-infundidas com a sua própria microbiota intestinal. A resistência à insulina dos que receberam infusão autóloga foi inalterada, enquanto os que receberam a infusão alogênica observaram-se aumento significativo na sensibilidade periférica à insulina e uma tendência para melhorar a sensibilidade à insulina hepática (VRIEZE et al., 2012).

Pesquisa realizada em ratos mostrou que depois de uma dieta rica em gordura foi observada redução das concentrações de *Bifidobacterium*, com aumento da atividade inflamatória, aumento da massa de gordura e da resistência à insulina (CANI et al., 2007). Adicionalmente, estudo realizado em indivíduos obesos observou que a proporção de Bacteroides/Firmicutes correlacionou-se positivamente com a glicemia de jejum (LARSEN et al., 2010).

Ressalta-se que mudanças na microbiota intestinal enviam sinais enteroendócrinos alterados para o sistema nervoso central, por meio da secreção de hormônios intestinais, tais como os péptido insulino-trópico, GLP-1, GLP-2, PYY que regula a homeostase, ingestão e armazenamento de energia, absorção de nutrientes e secreção da insulina (PANWAR et al., 2013).

### 2.2.1.2 Parâmetros lipídicos

Importante papel fisiológico do intestino no metabolismo dos lipídios é fornecido pela atividade da microbiota intestinal. Tem sido demonstrado que a microbiota intestinal regula os lipídios do plasma, contribuindo assim para o metabolismo de ácidos biliares. Os ácidos biliares primários sintetizados no fígado podem ser metabolizados em ácidos biliares secundários por bactérias intestinais por meio do processo de desconjugação e desidroxilação. Produção de ácido biliar excessiva associada com a obesidade conduz a uma maior quantidade de ácidos biliares secundários. As espécies de bactérias, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli* estão potencialmente envolvidos na geração de ácidos biliares secundários do cólon. (FUKIYA et al., 2009; FLOCK et al., 2011).

Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal se relaciona com os lipídios no sangue têm sido propostos. Propionato e acetato produzido a partir da fermentação bacteriana no cólon entram no fluxo sanguíneo para o fígado. O propionato diminui a síntese do colesterol por inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA). As concentrações séricas do propionato estão negativamente relacionadas com as concentrações séricas de LDL - colesterol e colesterol total. Já em relação ao acetato, ele é um precursor do acetil-CoA, envolvido na lipogênese hepática. A conjugação dos ácidos biliares pela microbiota intestinal aumenta a excreção fecal de ácidos biliares que, por sua vez, aumenta a demanda de colesterol no fígado para a síntese de novos ácidos biliares, reduzindo assim as concentrações de colesterol do sangue (FAVA et al., 2006).

Além disso, outros mecanismos têm sido propostos para explicar como a microbiota intestinal pode influenciar o metabolismo e armazenamento de lipídios. O LPS é uma endotoxina composta de lipídio e de polissacarídeo e este componente induz uma resposta imune inata. Estudos fornecem evidências de que o LPS contribui para o aumento do desenvolvimento do tecido adiposo, como também, que indivíduos obesos têm o dobro de concentrações circulantes de LPS devido ao aumento quilomícron (lipoproteína que transporta triglicérides e colesterol do intestino delgado para outros tecidos), diminuição na integridade da barreira intestinal, e diminuição na atividade da fosfatase alcalina, uma enzima envolvida na clivagem de LPS no intestino (CONNOR, 2013).

Dietas com alto teor de gordura também podem aumentar as concentrações de LPS no plasma de seres humanos. Estudo realizado por Cani et al (2007) mostrou em camundongos que o maior consumo

de gordura levou a um maior aumento nas concentrações de LPS no plasma. A absorção de LPS, reforçada pela alta ingestão de gordura, pode estimular a secreção de TNF e IL-6, resultando em inflamação sistêmica de baixo grau, dessa forma a microbiota intestinal pode ter papel ativo na promoção e/ou inibição da inflamação e, portanto um efeito no metabolismo lipídico (FLOCK; GREEN; KRIS-ETHERTON, 2011).

Destaca-se que o colesterol é continuamente transportado para o fígado, intestino e tecidos extra-hepáticos por lipoproteína de alta densidade (HDL-c), enquanto que os triacilgliceróis são transportados principalmente para o tecido adiposo, para armazenamento, e para o músculo, onde os ácidos graxos são oxidados para produção de energia. As lipoproteínas humanas são divididas em cinco classes principais de acordo com a densidade. As duas lipoproteínas ricas em triacilglicerol são os quilomícrons, que são excretados pelos enterócitos intestinais e transportam lipídios dietéticos, e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-c), que são excretadas pelos hepatócitos e transportam lipídios endógenos. As lipoproteínas de densidade intermediárias (IDL-c) contêm quantidades apreciáveis de triacilglicerol e ésteres de colesterol no seu núcleo. Por fim, as duas lipoproteínas ricas em colesterol, incluindo as de densidade baixa (LDL-c) e as de densidade alta (HDL-c), essas partículas não são excretadas diretamente do fígado, mas são produzidas por processos metabólicos na circulação (FAVA et al., 2006).

A LPL, desempenha um papel importante no metabolismo e transporte de lipídeos, esta enzima é responsável pela hidrólise de triacilglicerol. A microbiota intestinal pode afetar a atividade da LPL por meio da influência sobre a expressão do FIAF, a atividade desta enzima influencia a acumulação de triglicérides no tecido adiposo. O FIAF é um inibidor circulante da atividade da LPL, portanto a inibição da expressão do FIAF pela presença da microbiota intestinal permite o aumento da atividade da LPL e a acumulação de triacilglicerol nos adipócitos (MORREIRA et al, 2012).

A microbiota intestinal influencia as concentrações de colesterol sérico. Estudo realizado por Martínez et al. (2013a) caracterizou a microbiota fecal de hamsters, cujo metabolismo do colesterol foi modulado pela adição de ésteres de estero vegetal. Foi observada uma redução do colesterol total, pelo aumento da síntese de colesterol, resultando no aumento da excreção do colesterol biliar, como também foi observada alteração na composição da microbiota intestinal em relação às bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e

Firmicutes, e essa mudança apresentou correlação significativa com as concentrações de colesterol total, HDL-colesterol, colesterol não-HDL e colesterol hepático. Além disso, estudo realizado em humanos observou que as concentrações plasmáticas de HDL – colesterol foi positivamente associada com a abundância de Bacteroidetes. Ambas as concentrações de HDL - colesterol e Bacteroidetes foram mostradas diminuídas em indivíduos obesos (MARTÍNEZ et al 2013b). Alguns estudos que avaliam a associação entre a microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em mulheres obesas podem ser observados no Quadro 2.

De acordo exposto, a determinação da microbiota intestinal no pré-cirúrgico de cirurgia bariátrica e a constatação da relação da microbiota intestinal com os parâmetros metabólicos, podem ser utilizados como uma estratégia de melhora terapêutica para os pacientes após a realização desta cirurgia, como nisso propõe-se a realização deste estudo.

Quadro 2- Estudos de associação entre microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes com excesso de peso. (continua)

Estudo	População	Média do IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Microbiota intestinal (Obesos x Controle)	Microbiota intestinal e parâmetros metabólicos
Teixeira et al., 2013	Mulheres eutrófica (n= 17)  Mulheres Obesas (n= 15)	Mulheres eutrófica (21.2; 20.6-21.9)*  Mulheres Obesas (34.5; 32.8- 36.7)*	↓ <i>Bifidobacterium</i> gênero ↓ <i>L. plantaru</i> ↓ <i>B. longum</i> ↓ <i>C. coccoides</i> ↓ <i>C. leptum</i>	- HDL apresentou correlação positiva com <i>A. muciniphila</i> (r= 0,54), <i>Bifidobacterium</i> gênero (r= 0,35), <i>B. longum</i> (r= 0,35) e <i>C. leptum</i> (r= 0,40) - Triacilglicerol apresentou correlação negativa com <i>A. leptum</i> (r= -0,38) - A insulina e o HOMA-IR apresentaram respectivamente correlação negativa com <i>Bifidobacterium</i> gênero (r= -0,69; r= -0,65), <i>B. longum</i> (r= -0,47; r= -0,46), <i>C. coccoides</i> (r= -0,42; r= -0,38), <i>C. leptum</i> (r= -0,47; r= -0,47)
Munukka et al., 2012	Mulheres obesas com desordem metabólica (n=27)  Mulheres obesas (n=47)  Mulheres eutróficas (n=11)	Mulheres obesas com desordem metabólica (30,9 ± 2,9)  Mulheres obesas (29,1 ± 2,9)  Mulheres eutróficas (21,6 ± 2,0)	↔ <i>Bifidobacterium</i> ↔ <i>Atopobium cluster</i> ↔ <i>Bacteroides</i> group ↔ <i>F. prausnitzii</i>	- HDL apresentou correlação positiva com <i>Bacteroides</i> (r=0,346), e correlação negativa com o grupo <i>Eubacterium rectale-Clostridium coccoides</i> (r= -0,268) - Insulina apresentou correlação negativa com <i>Bacteroides</i> (r= -0,313) - Triacilglicerol apresentou correlação positiva com o grupo <i>Eubacterium rectale-Clostridium coccoides</i> (r= 0,362)

\* Mediana e intervalo interquartil; IMC – índice de massa corporal; ↔ nenhuma diferença significativa entre os grupos; ↓ significativamente menor que o grupo controle; ↑ significativamente maior que o grupo controle; HDL – Lipoproteína de alta densidade, HOMA- IR- Homeostases Model Assessment - Insulin Resistance.

Quadro 2 – estudos de associação entre microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes com excesso de peso (conclusão).

Estudo	População	Média do IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Microbiota intestinal (Obesos x Controle)	Microbiota intestinal e parâmetros metabólicos
Santacruz et al., 2010	Grávidas com sobrepeso (n= 16)  Grávidas eutróficas (n = 34)	Grávidas com sobrepeso (29,0; 27,8 - 32,7) *  Grávidas eutróficas (23,3; 21,0 - 25,0) *	↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↑ <i>E. coli</i> ↑ <i>Staphylococcus</i>	- Colesterol total apresentou correlação positiva com <i>Staphylococcus</i> (r= 0,068)  - HDL apresentou correlação positiva com <i>Bacteroides</i> (r= 0,518)

\* Mediana e intervalo interquartil; IMC – índice de massa corporal; ↔ nenhuma diferença significativa entre os grupos; ↓ significativamente menor que o grupo controle; ↑ significativamente maior que o grupo controle; HDL – Lipoproteína de alta densidade, HOMA- IR- Homeostases Model Assessment - Insulin Resistance.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp.* e associá-las com parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

✓ Avaliar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp.* e o pH fecal nas mulheres obesas mórbidas e comparar com as mulheres eutróficas.

✓ Determinar os parâmetros glicêmicos (insulina, glicemia de jejum, hemoglobina glicada) e os parâmetros lipídicos (colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c e triacilglicerol), nas mulheres obesas mórbidas e comparar com as mulheres eutróficas.

✓ Avaliar a resistência à insulina por meio do índice HOMA-IR nas mulheres obesas mórbida e comparar com as mulheres eutróficas.

✓ Associar os parâmetros glicêmicos, HOMA-IR e parâmetros lipídicos com as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* nas mulheres obesas mórbidas.



## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal, realizado no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), Florianópolis, SC. Foram avaliadas mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica assistidos pelo HU/UFSC.

### 4.2 AMOSTRA DE ESTUDO

A população do estudo foi representada por todos os indivíduos com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica do HU/UFSC, no período de outubro/2013 a abril/2014. A amostra do estudo foi constituída por mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica do referido hospital. A escolha de apenas esse gênero foi pelo fato que mais de 90% das cirurgias realizadas no referido hospital são feitas em mulheres, portanto tivemos como objetivo deixar a amostra mais homogênea. Essas mulheres faziam acompanhamento no ambulatório de Nutrição e realizavam tratamento dietoterápico sendo orientadas a seguir dieta hipocalórica com redução de todos os macronutrientes. O método de amostragem foi não probabilístico por conveniência.

Os critérios de inclusão seguiram os da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (2010): mulheres com idade entre 18 e 65 anos, IMC  $> 40 \text{ kg/m}^2$  ou  $>35 \text{ kg/m}^2$  com pelo menos uma comorbidade, e insucesso no tratamento não-farmacológico e farmacológico. Foram excluídos aqueles com limitações intelectuais significativas sem suporte familiar adequado; quadro de transtorno psiquiátrico não controlado; dependência alcoólica e/ou de drogas ilícitas; uso atual (nos últimos 30 dias) de fármacos anti-inflamatórios e/ou antibióticos e/ou imunossuppressores e/ou prebiótico e/ou probiótico e/ou simbiótico, fumantes e pacientes do sexo masculino.

Os critérios de inclusão para as mulheres sem obesidade foram: IMC entre 18,5 e 24,9  $\text{kg/m}^2$ ; peso estável nos últimos três meses; idade entre 18 e 65 anos. Critérios de exclusão: presença de doenças crônicas não transmissíveis, infecto-contagiosas ou intolerâncias/alergias alimentares; fumantes; consumo habitual de mais de uma dose de bebida

alcoólica por semana (metade de uma garrafa ou uma lata de cerveja, uma taça de vinho ou uma dose de licor) (WHO, 2000b); atletas ou praticantes de atividade física intensa ( $>6$  MET)<sup>1</sup> (WHO, 2010a); uso prévio ou atual de drogas; uso de fármacos que influenciam o apetite, a motilidade intestinal ou absorção de nutrientes, antibióticos, anti-inflamatórios, imunossupressores, hipolemiantes, antidiabéticos orais, insulina, anti-hipertensivos, diuréticos, laxantes, antiácidos ou suplementos nutricionais nos últimos três meses; uso de prebióticos, probióticos ou simbióticos nos últimos três meses; grávidas ou lactantes; vegetarianas; seguimento de uma dieta para perda ou ganho de peso nos últimos três meses; submetido previamente a cirurgias gastrointestinais; história pessoal de distúrbios gastrointestinais (constipação, diarreia, pirose, inchaço, flatulência em excesso, dor abdominal).

Para os indivíduos aptos a participar da pesquisa, foi apresentada à proposta do trabalho e efetuada o convite de participação. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ocorreu neste mesmo momento, após leitura em conjunto (Apêndice A).

### 4.3 PROTOCOLO DO ESTUDO

Neste estudo foi realizada a identificação dos indivíduos (Apêndice B), coleta de fezes para avaliação da microbiota intestinal, coleta de sangue para avaliação dos parâmetros metabólicos, coleta de dados clínicos e antropométricos (Apêndice C)

#### 4.3.1 Instrumentos e técnicas de coleta de dados

##### 4.3.1.1 Identificação dos indivíduos

---

<sup>1</sup> Equivalente metabólico (MET) é comumente usado para expressar a intensidade das atividades físicas. Um MET é definido como o custo da energia de sentar-se em silêncio e é equivalente ao consumo calórico de 1 kcal/kg/hora. Estima-se que o consumo calórico para praticantes de atividade física intensa é mais de seis vezes superior a um MET. Exemplo: corrida ( $> 8$  km/h), caminhada veloz em uma colina/montanha/morro, pedalada ( $> 16$  km/h), ginástica aeróbica, natação rápida, jogos e esportes em nível de competição, escavação pesada ( $> 4,5$  kg/min), carregar cargas pesadas ( $>20$  kg).

Os indivíduos participantes do estudo foram identificados por meio de dados pessoais: nome completo, cor da pele (branca, não branca), data de nascimento, endereço residencial, telefone, e-mail e número de prontuário.

#### 4.3.1.2 Coleta do material fecal

Os participantes do estudo foram orientados a defecar em um recipiente de plástico e, logo em seguida, transferir uma pequena quantidade de fezes (dois gramas) para um saco plástico com fecho hermético para impedir a entrada de ar (material que foi fornecido pelos pesquisadores, sem custos para o indivíduo). As amostras foram devidamente identificadas pelos pesquisadores e analisadas no Laboratório de Gestão de Qualidade em Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina. O tempo máximo do ato da defecação até o recebimento das amostras pelos pesquisadores não ultrapassou 3 horas.

#### 4.3.1.3 Determinação do conteúdo de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal

##### 4.3.1.3.1 Preparo do meio de cultura

De acordo com Munõa e Pares (1988) a adição de determinados antibióticos ao RCA (Reinforced Clostridial Agar<sup>®</sup> Vadhani Indl. Estate, Mumbai, India) forma o meio BIM-25 (*Bifidobacterium* iodoacetate medium 25), que é seletivo para o isolamento de *Bifidobacterium spp.* Para o preparo de um litro de meio, 45 gramas de RCA (Himedia<sup>®</sup>) foram pesados, dissolvidos em 1L de água destilada e deionizada e autoclavado a 121°C por 18 minutos. Após resfriar e atingir a temperatura de aproximadamente 50°C, os antibióticos (0,02 g/L de ácido nalidíxico, 0,0085 g/L de sulfato de polimixina B, 0,05 g/L de sulfato de kanamicina, 0,025 g/L de ácido iodoacético, 0,025 g/L de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e 0,005 g/L de anfotericina B) foram adicionados ao meio. O meio foi distribuído em placas de petri estéreis.

O preparo do meio dos *Lactobacillus spp.*, foi de acordo Yoshioka, Iseki e Fujita (1983), para preparar 1 L do meio, 70 g de Agar MRS (Demam, Rogosa e Sharpe) *Lactobacillus* (Acumedia<sup>®</sup>) foram

pesados, dissolvidos em 1 L de água destilada e deionizada e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Depois de transcorrido esse tempo o meio foi distribuído em placas de petri estéreis.

#### 4.3.1.3.2 Preparo do tampão

O tampão fosfato 0,25 M estéril continha 34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em um litro de água destilada e o pH foi ajustado em 7,2 com NaOH 1N. O tampão de uso 0,31 mM foi feito no momento do uso pela diluição de 1,25 mL de tampão estoque em quantidade suficiente para um litro de água estéril.

#### 4.3.1.3.3 Processamento das amostras de fezes

De cada indivíduo, um grama de fezes foi pesado e diluído em nove mililitros de água destilada e deionizada estéril para aferição do pH em pHmetro PHTEK<sup>®</sup>. De cada indivíduo também foi pesado um grama de fezes e diluído em nove mililitros de tampão fosfato 0,31 mM. A partir desta diluição ( $10^{-1}$ ) foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$  por meio da transferência de 100  $\mu\text{L}$  da diluição anterior para microtubos estéreis contendo 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,31 mM cada. O inóculo (100  $\mu\text{L}$ ) de cada diluição  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  foi semeado uniformemente em toda a superfície do Agar (específico para cada bactéria: *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*) utilizando alça de Drigalski estéril. As placas, identificadas com as respectivas diluições e meios, foram incubadas a 37°C durante 72 horas (*Bifidobacterium spp.*) e 48 horas (*Lactobacillus spp.*) em jarra de anaerobiose com sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (Anaerobac, Probac<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Após a incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bifidobactérias e de lactobacilos, e determinado o número de colônias por grama de fezes. Para todos os tipos de colônias isoladas foram realizadas coloração de Gram, prova da catalase. A reação da enzima frutose-6-fosfato-fosfocetolase foi realizada para confirmação do gênero *Bifidobacterium spp.*

#### 4.3.1.3.4 Coloração de Gram

A coloração de Gram consistiu em tratar bactérias sucessivamente com cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fuccina. As

bactérias Gram-positivas tiveram coloração roxa e as Gram negativas tiveram coloração vermelha (BIER, 1966).

#### 4.3.1.3.5 Prova da catalase

A prova da catalase consistiu em adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio sobre uma placa contendo uma colônia de bactéria, como o objetivo de verificar se há formação de bolhas. As bactérias foram classificadas catalase positiva quando houve formação de bolhas e catalase negativas quando não houve formação de bolhas (BIER, 1966).

#### 4.3.1.3.6 Identificação do gênero *Bifidobacterium spp.* por meio da reação F6PPK.

O método de detecção da F6PPK primeiramente descrito por SCARDOVI (1986), com modificações de Orban e Patterson (2000) foi utilizado para a identificação do gênero *Bifidobacterium spp.* Todas as bactérias Gram positivas, em forma bacilar a cocoide e catalase negativas, observadas na sementeira das fezes foram cultivadas em 10 mL de caldo clostridial reforçado (Himedia) em jarras de anaerobiose, a 37°C por 42 horas. Após esse período os caldos foram centrifugados a 10.000 g, a 4°C, por 15 minutos. Os pellets foram lavados duas vezes com solução 1 (tampão fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M contendo cisteína-HCl 500  $\text{mg.l}^{-1}$  e pH 6,5) e ressuspendidos em 1 mL da mesma solução. As células bacterianas foram rompidas pela adição de 0,4 mL de brometo de cetrimide (45  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) por um período de 5 minutos. Em seguida, 0,25 mL da solução 2 ( $\text{NaF}$  3  $\text{mg.ml}^{-1}$  e iodoacetato de sódio 5  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) e 0,25 mL da solução 3 (frutose-6-fosfato 80  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) foram adicionados, misturados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, para interromper a reação, 1,5 mL de solução 4 (hidroxilamina-HCl 13  $\text{g.dl}^{-1}$  em água, pH 6.5) foi adicionado, misturado e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Um mililitro de ácido tricloroacético a 15% (p/v) e um mililitro de HCl 4N foram adicionados para acidificar o meio. Um mililitro do indicador de cor, cloreto férrico ( $\text{FeCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5% em HCl 0,1 M) foi adicionado e a solução agitada. O desenvolvimento de cor violeta indica a presença da enzima F6PPK e a coloração amarela indica resultado negativo.

#### 4.3.1.4 Coleta do material sanguíneo

Um total de 8 mL de sangue venoso periférico foi coletado de todos os participantes do estudo, após jejum noturno de 12 horas, por profissional capacitado de acordo com técnica padronizada (WHO, 2010b) na região cubital do antebraço, utilizando um tubo contendo ácido 50 etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e um tubo contendo gel separador (sistema Vacutainer® BD Biosciences - Abingdon, UK).

O tubo de sangue com EDTA ficou retido no laboratório de análises clínicas do HU/UFSC para determinação de HbA<sub>1c</sub> no sangue total. O tubo de sangue com gel separador também ficou retido no laboratório de análises clínicas do HU/UFSC para determinação sérica de triglicerídeos, colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, glicemia de jejum e insulina. O sangue foi deixado em repouso por 30 minutos até completa coagulação. Em seguida, foi centrifugado por um período de 10 a 15 minutos a 4700-5100 rpm para a separação do soro.

#### 4.3.1.5 Determinação da insulina

A insulina foi determinada pelo ensaio imunométrico por quimioluminescência com enzima marcada em fase sólida, utilizado o kit Immulite 2000 systems® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA). Princípios do procedimento para dosagem de insulina: A fase sólida (esfera) é revestida com anticorpo monoclonal murino anti-insulina. A fase líquida é constituída por fosfatase alcalina (intestino de vitela) conjugada com anticorpo policlonal de ovelha anti-insulina e fosfatase alcalina (intestino de vitela) conjugada com anticorpo monoclonal murino anti-insulina. A amostra e o reagente foram incubados em conjunto com as esferas revestidas durante 60 minutos. Neste período, a insulina na amostra forma um complexo de anticorpos em *sandwich* com o anticorpo monoclonal murino anti-insulina na esfera, enzima conjugada com anticorpo policlonal de ovelha anti-insulina e enzima conjugada com anticorpo monoclonal murino anti-insulina no reagente. A amostra não ligada e a enzima conjugada foram removidas por meio de lavagens e centrifugação. Finalmente, o substrato quimioluminescente foi adicionado ao tubo de reação que contém as esferas e o sinal foi gerado em proporção à quantidade de enzima ligada. Os valores de insulina serão expressos em  $\mu\text{IU/mL}$ .



Limite mínimo de detecção: 2  $\mu\text{IU/mL}$ . Valor de referencia para o método usado foi de  $< 29,1 \mu\text{IU/mL}$ .

#### 4.3.1.6 Determinação da glicemia de jejum e hemoglobina glicada

A glicemia de jejum foi determinada pelo método enzimático, de acordo com as instruções do fabricante (Dimension RxL Max<sup>®</sup> - Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Newark, DE, U.S.A.). Princípios do procedimento: A hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose na presença de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e magnésio, formando glicose-6-fosfato (G-6-P) e adenosinadifosfato (ADP). A G-6-P é então oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para produzir 6-fosfogliconato e NADH. Um mole de NAD é reduzido para um mole de NADH para cada mole de glicose presente. A absorvância foi determinada utilizando uma técnica bicromática de ponto final (340 e 383 nm). Os valores foram expressos em mg/dL. Limite mínimo de detecção: 1 mg/dL. Valor de referência para o método usado foi de  $< 100 \text{ mg/dL}$ .

A HbA<sub>1C</sub> foi determinada pelo método de cromatografia de troca iônica, utilizando o equipamento D-10 Hemoglobin A1C da BIO-RAD<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA). Princípios do procedimento: As amostras foram diluídas automaticamente no equipamento D-10 e injetadas no cartucho analítico. O equipamento D-10 cria um gradiente crescente de tampão de força iônica programado no cartucho, em que as hemoglobinas são separadas com base em suas interações iônicas com o material do cartucho. As hemoglobinas separadas, em seguida, passam separadas através da célula de fluxo do fotômetro de filtro, que mede alterações na absorvância a 415 nm. O software D-10 realiza a redução dos dados brutos obtidos em cada uma das análises. Uma calibração de dois níveis é utilizada para a quantificação dos valores de HbA<sub>1C</sub>. Um relatório de amostra e um cromatograma são gerados para cada amostra, com sombreamento da área do pico de A1c. Esta área é calculada utilizando uma distribuição de Gauss exponencialmente modificada. Os valores foram expressos em percentual. Limite mínimo de detecção: 3,8%. Valores de referência para o método usado foi de 4,3 a 6,1%.

#### 4.3.1.7 Determinação da Resistência à insulina

O Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance (HOMA- IR) é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina. Este índice indica o grau de combinação de uma dada hiperglicemia com concentrações basais de insulina baixa, normal e elevada (MATTHEWS et al., 1985). O HOMA- IR tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência à insulina e a função das células  $\beta$ , a partir das concentrações de insulina e glicose de jejum, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose (mmol/L)}}{22,5}$$

Os valores de HOMA-IR determinam a eficácia das concentrações de insulina de jejum em equilíbrio para regular a glicose sanguínea. Valores acima de 2,71 indicam um quadro de resistência à insulina (MATTHEWS et al., 1985).

#### 4.3.1.8 Determinação do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos

Colesterol total, HDL-c e triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático colorimétrico, kit cartucho Flex<sup>®</sup> Reagent CHOL, AHDL e TGL, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Dimension RxL Max<sup>®</sup> - Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Newark, DE, U.S.A.). O LDL-colesterol foi determinado utilizando a equação de Friedewald (LDL-c = Colesterol total - HDL-c - Triglicerídeos/5), em que Triglicerídeos/5 representa o VLDL-c (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Os valores foram expressos em mg/dL. Valor de referência usado para o LDL-c e VLDL-c foi de <100 mg/dL e <30mg/dL respectivamente.

Princípios do procedimento para dosagem de colesterol total: A esterase do colesterol catalisa a hidrólise dos ésteres de colesterol para produzir colesterol livre que, juntamente com o colesterol livre pré-existente, é oxidado numa reação catalisada pela oxidase do colesterol para formar colest-4-eno-3-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase de rábano silvestre, o peróxido de hidrogênio formado desta forma é utilizado para oxidar a N,N-dietilanilina-HCl /4-

aminoantipirina, produzindo um cromóforo que absorve a 540 nm. A absorvância devida à N,N-dietilnilina-HCl/4-aminoantipirina oxidada é diretamente proporcional à concentração de colesterol total e é medida utilizando uma técnica policromática de ponto final (452, 540, 700 nm). Limite mínimo de detecção: 50 mg/dL. Valor de referência para o método usado foi de < 200 mg/dL.

Princípios do procedimento para dosagem de HDL-c: Na primeira reação, os quilomícrons, VLDL-c e LDL-c formam, na presença de sulfato de magnésio, complexos hidrossolúveis com o sulfato de dextrano. Estes complexos são resistentes às enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase modificadas pelo polietileno glicol, que reagem com o HDL-c. Na presença de oxigênio, o HDL-c é oxidado para  $\Delta^4$ -colestenona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio produzido reage, em seguida, com a 4-aminoantipirina e a N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3.5-dimetoxianilina sódica na presença de peroxidase, formando um corante colorido que é medido utilizando uma técnica bicromática de ponto final (600/700 nm). A intensidade de cor do corante é diretamente proporcional à concentração sérica de HDL-c. Limite mínimo de detecção: 3 mg/dL. Valor de referência para o método usado foi de >60 mg/dL.

Princípios do procedimento para dosagem de triglicerídeos: A amostra é incubada com o reagente enzimático de lipase lipoproteica que converte os triglicerídeos em glicerol livre e ácidos graxos. A glicerol quinase catalisa a fosforilação do glicerol pela adenosina-5-trifosfato para glicerol-3-fosfato. A glicerol-3-fosfato-oxidase oxida o glicerol-3-fosfato para fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A ação catalítica da peroxidase forma quinoneimina a partir de  $H_2O_2$ , aminoantipirina e 4-clorofenol. A variação na absorvância devida à formação de quinoneimina é diretamente proporcional à quantidade total de glicerol e dos seus precursores na amostra e é medida utilizando uma técnica bicromática de ponto final (510, 700 nm). Limite mínimo de detecção: 15 mg/dL. Valor de referência para o método usado foi de  $\leq$  100 mg/dL.

#### 4.3.1.9 Avaliação do estado nutricional

Para a avaliação do estado nutricional foram realizadas aferições antropométricas de peso e estatura por profissional capacitado, seguindo técnicas propostas pela *World Health Organization* (WHO, 1995).

O peso foi mensurado utilizando uma balança eletrônica (Welmy<sup>®</sup>, Santa Bárbara do Oeste, SP), com capacidade de 300 kg e precisão de 50 g. Os indivíduos foram pesados com o mínimo de indumentária, descalços, na posição ereta no centro da plataforma da balança e com os braços soltos ao longo do tronco (WHO, 1995).). A altura foi medida por um estadiômetro acoplado à plataforma com capacidade de 2,00 m e precisão de 0,5 centímetros. O IMC foi calculado como peso (kg) / altura<sup>2</sup> (m). A classificação do estado nutricional foi realizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC) utilizando-se os pontos de corte definidos pela WHO (2008), conforme descrito no Quadro 3. O IMC é definido como o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m<sup>2</sup>) (WHO, 1995).

Quadro 3- Classificação do estado nutricional segundo o Índice de Massa Corporal

<b>Classificação</b>	<b>Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Eutrofia	18,50-24,99
Sobrepeso	≥ 25,00
Pré-obesidade	25,00-29,99
Obesidade	≥ 30,00
Obesidade grau I	30,00-34,99
Obesidade grau II	35,00-39,99
Obesidade grau III	≥ 40,00

Fonte: WHO, 2008.

#### 4.3.1.10 Parâmetros clínicos e demográficos

Idade, comorbidades associadas e fármacos utilizados foram obtidos do prontuário do paciente. Dados referentes à cor da pele, alterações gastrointestinais, hábitos intestinais e realização de cirurgia anterior no trato gastrointestinal foram coletados em entrevista direta.

#### 4.4 MODELO DE ANÁLISE

No quadro 4 estão descritas as variáveis e seus indicadores, que foram utilizados nas análises do estudo.

Quadro 4 - Variáveis, suas características e indicadores utilizados para o modelo de análise.

<b>Variáveis</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Classificação teórica</b>
Idade	Anos	Independente, quantitativa discreta
Cor da pele	Não branca Branca	Independente, qualitativa dicotômica
Estatura	M	Independente, quantitativa contínua
Peso	Kg	Dependente, quantitativa contínua
Índice de Massa Corporal	kg/m <sup>2</sup>	Dependente, quantitativa contínua
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Unidades formadoras de colônias	Dependente, quantitativa contínua
<i>Lactobacillus spp.</i>	Unidades formadoras de colônias	Dependente, quantitativa contínua
pH fecal	-	Dependente, quantitativa contínua
Insulina	μU/MI	Dependente, quantitativa contínua
Glicemia de jejum	mg/dL	Dependente, quantitativa contínua
Hemoglobina Glicada	%	Dependente, quantitativa contínua
HOMA-IR	-	Dependente, quantitativa contínua
Colesterol total	mg/dL	Dependente, quantitativa contínua
HDL-colesterol	mg/dL	Dependente, quantitativa contínua
LDL-colesterol	mg/dL	Dependente, quantitativa contínua
VLDL-colesterol	mg/dL	Dependente, quantitativa contínua
Triglicérides	mg/Dl	Dependente, quantitativa contínua

#### 4.5 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram organizados e registrados com dupla entrada em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010<sup>®</sup>. A análise estatística foi realizada no programa estatístico STATA<sup>®</sup> versão 11.0 para Windows<sup>®</sup> (Stata Corp., College, Texas, EUA). As variáveis contínuas foram sintetizadas em média e desvio padrão quando a distribuição foi simétrica, ou mediana e intervalo interquartil quando a distribuição foi assimétrica. Em contrapartida, as variáveis categóricas foram descritas em categorias e frequência. Para avaliação da normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk; se o resultado do teste de Shapiro-Wilk fosse  $<0,05$ , rejeitava-se a normalidade dos dados. Neste caso, foram utilizados testes não-paramétricos. Para verificar diferenças entre os grupos de estudo foi utilizado o Teste-T (variáveis simétricas e homogeneidade das variâncias) ou Mann-Whitney (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias). Para verificar a associação entre a avaliação da microbiota intestinal e os parâmetros bioquímicos, as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* foram categorizadas em tercil, para essa associação foi utilizado o teste de ANOVA (variáveis simétricas e homogeneidade das variâncias) ou Kruskal Wallis (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias), foi aplicado o teste ANOVA de tendência e teste de tendência pra dados não paramétricos, quando houve uma tendência de aumento ou diminuição dos valores entre as variáveis politômicas. Para variáveis categóricas dicotômicas, as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste Exato de Fisher. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ( $p<0,05$ ).

#### 4.6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) no dia 15 de abril de 2013, com o CAAE nº 13778413.1.0000.0121 e parecer nº 245.650 (Anexo A).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 MANUSCRITO**

**Obesidade mórbida: Associação entre microbiota intestinal (*Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*) e parâmetros metabólicos**

**Título curto:** Microbiota intestinal em obesas mórbidas

**Conflito de interesse:**

No presente estudo não há conflito de interesse

**Financiamentos**

Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC - Programa de Bolsas Demanda Social / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); concessão de bolsa de estudo ao autor principal.

## Resumo

**Introdução e objetivos:** A microbiota intestinal desempenha um papel importante na patogênese da obesidade e nas desordens metabólicas associadas. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, pH fecal e parâmetros metabólicos das mulheres obesas e comparar com as mulheres eutróficas, e associar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* com os parâmetros metabólicos, em mulheres com obesidade mórbida. **Métodos:** Estudo transversal realizado com 19 mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica e 13 mulheres eutróficas. Foram realizadas coleta de fezes para determinação das concentrações de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal, coleta de sangue para determinação dos parâmetros lipídicos e glicêmicos, coleta de dados clínicos e avaliação do estado nutricional. Para todos os testes estatísticos realizados, foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ . **Resultados:** As concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal das mulheres obesas não diferiram das mulheres eutróficas. As concentrações plasmáticas de HDL-c, VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR, apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo ( $p < 0,05$ ). Não houve associação da microbiota intestinal como os parâmetros glicêmicos e lipídicos, em mulheres com obesidade mórbida. **Conclusão:** As concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* são similares nos grupos estudados, como também não houve associação dessas bactérias com os parâmetros metabólicos. Resultados esses com possível influência do período de acompanhamento e orientações nutricionais, que antecedem a indicação da cirurgia. Não obstante, o presente estudo confere subsídio para a continuidade de estudos longitudinais que avaliem intervenções.

**Palavras-chave:** Microbiota intestinal; parâmetro glicêmico; perfil lipídico; obesidade mórbida.



## Introdução

A obesidade é um dos problemas de saúde pública que mais cresce no mundo, a ponto de ser considerada uma epidemia global. De acordo com a *World Health Organization* (WHO) a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, representando um problema de abrangência mundial (1).

Na obesidade o acúmulo de tecido adiposo leva à produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de um quadro de inflamação crônica, podendo interferir em várias vias metabólicas do organismo, tais como a via de sinalização de insulina, que pode alterar a homeostase glicêmica e culminar com o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2, bem como alterações no perfil lipídico, resultando em dislipidemia (2, 3).

Além dos fatores comumente envolvidos nas disfunções metabólicas presentes no indivíduo obeso, a microbiota intestinal pode estar relacionada com a patogênese e a progressão da obesidade, particularmente na regulação de energia e no armazenamento de gordura. Este processo é decorrente de diversos mecanismos, dentre eles: a absorção de energia a partir da dieta, a regulação do armazenamento de gordura, lipogênese e oxidação de ácidos graxos, modulação de hormônios peptídicos gastrointestinais aferentes e indução da endotoxemia metabólica (4).

Estudos têm demonstrado que ratos *germ-free* são resistentes à obesidade induzida por dieta, os mecanismos metabólicos subjacentes a esta resistência incluem a diminuição da absorção de glicose, geração de ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal, redução da lipogênese hepática, aumento da oxidação de ácidos graxos e diminuição no depósito de triacilglicerol nos adipócitos (5-7).

Ressalta-se que quando em disbiose, a microbiota intestinal do indivíduo obeso pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação e da resistência à insulina, por meio do seu papel na regulação da homeostase da energia, do armazenamento de gordura e pela inflamação crônica que pode induzir (8).

Neste contexto, observa-se que a microbiota intestinal pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade, assim como nas desordens metabólicas associadas. Portanto, o objetivo desse estudo foi de avaliar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, pH fecal e parâmetros metabólicos das

mulheres obesas e comparar com as mulheres eutróficas, como também associar as concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* com os parâmetros metabólicos, em mulheres com obesidade mórbida.

## **Métodos**

### *Delineamento e participantes do estudo*

Participaram deste estudo transversal mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de 24 horas de cirurgia bariátrica, assistidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), SC, Brasil, no período de outubro de 2013 a abril de 2014. Essas mulheres estavam sendo acompanhadas no ambulatório de Nutrição e realizavam tratamento dietoterápico sendo orientadas a seguir dieta hipocalórica com redução de todos os macronutrientes, por um tempo médio de 2 anos e meio.

O método de amostragem foi não probabilístico por conveniência. Os critérios de inclusão para as mulheres com obesidade mórbida foram: indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> ou >35 kg/m<sup>2</sup> com pelo menos uma comorbidade, e insucesso no tratamento não-farmacológico e farmacológico. Foram excluídos aquelas com limitações intelectuais significativas sem suporte familiar adequado; quadro de transtorno psiquiátrico não controlado; dependência alcoólica e/ou de drogas ilícitas; uso atual (nos últimos 30 dias) de fármacos anti-inflamatórios e/ou antibióticos e/ou imunossupressores e/ou prebiótico e/ou probiótico e/ou simbiótico, fumantes e pacientes do sexo masculino.

Um grupo de mulheres eutróficas foi recrutado pra efeito de comparação com o grupo de mulheres obesas. Os critérios de inclusão para os indivíduos sem obesidade foram: IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>; peso estável nos últimos três meses; idade entre 18 e 65 anos. Critérios de exclusão: presença de doenças crônicas não transmissíveis, infecto-contagiosas ou intolerâncias/alergias alimentares; atletas ou praticantes de atividade física intensa (>6 MET); fumantes; consumo habitual de mais de uma dose de bebida alcoólica por semana (metade de uma garrafa ou uma lata de cerveja, uma taça de vinho ou uma dose de licor); uso prévio ou atual de drogas; uso de fármacos que influenciam o apetite, a motilidade intestinal ou absorção de nutrientes, antibióticos, anti-inflamatórios, imunossupressores, hipolemiantes, hipoglicemiantes

orais, insulina, anti-hipertensivos, diuréticos, laxantes, antiácidos ou suplementos nutricionais nos últimos três meses; uso de prebióticos, probióticos ou simbióticos nos últimos três meses; grávidas ou lactantes; vegetarianos; seguimento de uma dieta para perda ou ganho de peso nos últimos três meses; submetido previamente a cirurgias gastrointestinais; história pessoal de desordens gastrointestinais (constipação, diarreia, pirose, inchaço, flatulência em excesso, dor abdominal).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina com o número 13778413.1.0000.0121, que está em conformidade com a Declaração Médica Mundial do Helsink (9) e suas emendas. Os participantes foram convidados a participar e os que concordaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### *Protocolo de coleta e preparo do material biológico*

A coleta do material fecal foi realizada no HU/UFSC. Os participantes do estudo foram orientados a defecar em um recipiente de plástico e, logo em seguida, transferir uma pequena quantidade de fezes para um saco plástico com fecho hermético. Após esses procedimentos, os pesquisadores analisavam as amostras no Laboratório de Gestão de Qualidade em Análises Clínicas. O tempo máximo do ato da defecação até as análises não ultrapassou 3 horas.

Em relação à coleta sanguínea, um total de 8 mL de sangue venoso periférico foi coletado, após jejum noturno de 12 horas, por profissional capacitado de acordo com técnica padronizada (10)

#### *Avaliação da microbiota intestinal*

De cada indivíduo, um grama de fezes foi pesado e diluído em nove mililitros de água destilada e deionizada estéril para aferição do pH em pHmetro PHTEK<sup>®</sup>. De cada indivíduo também foi pesado um grama de fezes e diluído em nove mililitros de tampão fosfato 0,31 mM. A partir desta diluição ( $10^{-1}$ ) foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$  por meio da transferência de 100  $\mu$ L da diluição anterior para microtubos estéreis contendo 900  $\mu$ L de tampão fosfato 0,31 mM cada. O inóculo (100  $\mu$ L) de cada diluição  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  foi semeado uniformemente em toda a superfície do Ágar, específico para cada bactéria *Bifidobacterium spp* (11) e *Lactobacillus spp* (12). As placas, identificadas com as respectivas diluições e meios, foram incubadas a 37°C durante 72 horas (*Bifidobacterium spp.*) e 48 horas (*Lactobacillus*

*spp.*) em jarra de anaerobiose com sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (Anaerobac, Probac<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil). Após a incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bifidobactérias e de lactobacilos, e determinado o número de colônias por grama de fezes. Para todos os tipos de colônias isoladas foram feitas laminas que foram coradas para a realização da coloração de Gram e prova da catalase. A reação da enzima frutose-6-fosfato-fosfocetolase foi realizada para confirmação do gênero das *Bifidobacterium spp.*

#### *Avaliação dos parâmetros metabólicos*

A insulina foi determinada pelo ensaio imunométrico por quimioluminescência com enzima marcada em fase sólida, utilizando o kit Immulite 2000 systems<sup>®</sup> (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA). A glicemia de jejum foi determinada pelo método enzimático, de acordo com as instruções do fabricante (Dimension RxL Max<sup>®</sup> - Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Newark, DE, U.S.A.). A HbA<sub>1c</sub> foi determinada pelo método de cromatografia de troca iônica, utilizando o equipamento D-10 Hemoglobina A1C da BIO-RAD<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA). O cálculo do HOMA-IR foi realizado utilizando a fórmula:  $HOMA = \text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose } (\text{mmol/L}) / 22,5$  (13). Colesterol total, HDL-c e triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático colorimétrico, kit cartucho Flex<sup>®</sup> Reagent CHOL, AHDL e TGL, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Dimension RxL Max<sup>®</sup> - Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Newark, DE, U.S.A.). O LDL-c foi determinado utilizando a equação de Friedewald ( $LDL\text{-c} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-c} - \text{Triglicerídeos}/5$ ), em que Triglicerídeos/5 representa o VLDL-c (14).

#### *Avaliação do estado nutricional*

Para a avaliação do estado nutricional foram realizadas aferições antropométricas de peso e estatura por profissional capacitado, seguindo técnicas propostas pela WHO (15). O peso foi mensurado utilizando uma balança eletrônica (Welmy<sup>®</sup>, Santa Bárbara do Oeste, SP), com capacidade de 300 kg e precisão de 50 g. Os indivíduos foram pesados com o mínimo de indumentária, descalços, na posição ereta no centro da plataforma da balança e com os braços soltos ao longo do tronco (15). A altura foi medida por um estadiômetro acoplado à plataforma com capacidade de 2,00 m e precisão de 0,5 centímetros. O

IMC foi calculado como peso (kg)/altura<sup>2</sup> (m) e classificado de acordo com a WHO (16).

#### *Avaliação de variáveis demográficas e clínicas*

Idade, comorbidades associadas e fármacos utilizados foram obtidos do prontuário do paciente. Dados referentes à cor da pele, alterações gastrointestinais, hábitos intestinais e realização de cirurgia anterior no trato gastrointestinal foram coletados em entrevista direta.

#### *Análise estatística*

Os dados foram organizados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010<sup>®</sup>. A análise estatística foi realizada no programa estatístico STATA<sup>®</sup> versão 11.0 para Windows<sup>®</sup> (Stata Corp., College, Texas, EUA). As variáveis contínuas foram sintetizadas em média e desvio padrão quando a distribuição foi simétrica, ou mediana e intervalo interquartil quando a distribuição foi assimétrica. Em contrapartida, as variáveis categóricas foram descritas em categorias e frequência. Para avaliação da normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Para verificar diferenças entre os grupos de estudo foi utilizado o Teste-T (variáveis simétricas e homogeneidade das variâncias) ou Mann-Whitney (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias). Para verificar a associação entre a avaliação da microbiota intestinal e os parâmetros bioquímicos, as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* foram categorizadas em tercil, para esse associação foi utilizado o teste de ANOVA (variáveis simétricas e homogeneidade das variâncias) ou Kruskal Wallis (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias), foi aplicado o teste ANOVA de tendência e teste de tendência para dados não paramétricos, quando houve uma tendência de aumento ou diminuição dos valores entre as variáveis politômicas. Para variáveis categóricas dicotômicas, as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste Exato de Fisher. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% (p<0,05).

## **Resultados**

Trinta e duas cirurgias bariátricas foram realizadas entre o período de outubro de 2013 a abril de 2014. Das 27 mulheres elegíveis, obteve-se um percentual de perda de 29,6%, pelo fato dessas mulheres

não conseguirem evacuar antes da cirurgia e por desistirem do estudo, desta forma a amostra de estudo foi constituída por 19 mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica, sendo que três foram pra cirurgia sem realizar a coleta de sangue, por falha na operacionalização da coleta. O grupo de mulheres eutróficas foi composto por 13 mulheres eutróficas (Figura 1).

#### *Características das participantes do estudo.*

A mediana de idade do grupo de mulheres obesas foi de 34 anos e do grupo de mulheres eutróficas foi de 26 anos. Nas mulheres com obesidade mórbida, as doenças associadas mais freqüentes foram hipertensão arterial sistêmica (63%), esteatose hepática (42%) e diabetes mellitus tipo 2 (32%). Os medicamentos mais utilizados foram anti-hipertensivos (52%), diuréticos tiazídicos (26%) e hipoglicemiantes orais (26%). Nenhuma cirurgia anterior no trato gastrointestinal foi realizada pelas participantes do estudo. A maioria das mulheres era da cor branca e não apresentava constipação. As alterações gastrointestinais presentes foram gases (n=4), diarréia (n=3), constipação (n=2) e vômito (n=1) (Tabela 1).

#### *Microbiota intestinal e parâmetros metabólicos*

As concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e pH fecal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de estudo, embora, as concentrações de *Bifidobacterium spp.* tenham apresentado-se maiores no grupo das mulheres com obesidade mórbida. Em contraste, as concentrações plasmáticas de HDL-c, VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR, apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Mulheres com obesidade mórbida tinham maiores concentrações de HDL-c e menores concentrações de VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada e HOMA-IR quando as concentrações de *Bifidobacterium spp.* foram maiores, embora essas alterações não tenham sido significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). As concentrações de LDL-c foram menores quando houve uma maior concentração de *Lactobacillus spp.*, contudo essa modificação não foi significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

## Discussão

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na patogênese da obesidade, indivíduos obesos possuem alteração na composição dessa microbiota, caracterizando assim um quadro de disbiose (4, 17). Entretanto, no presente estudo, quando se comparou a microbiota intestinal de mulheres obesas mórbidas com mulheres eutróficas não se observou diferença nas concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*. Porém deve-se ressaltar o fato de que o grupo de mulheres obesas foi composto de mulheres no pré-operatório de cirurgia bariátrica e, portanto, realizavam tratamento dietoterápico sendo orientadas a seguir dieta hipocalórica com redução de todos os macronutrientes.

Sabe-se que a composição da microbiota intestinal é influenciada por vários fatores ambientais, dentre eles a alimentação. Estudos mostram que as mudanças na concentração de bactérias nos indivíduos obesos podem ser revertidas depois de uma perda de peso induzida por dieta, fazendo com que a microbiota do indivíduo obeso se assemelhe à de um indivíduo eutrófico (18, 19). Situação essa que pode ter acontecido com as mulheres obesas mórbidas do presente estudo.

Resultado semelhante ao nosso estudo foi encontrado por Zuo et al (20), que avaliaram as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* em indivíduos obesos de ambos os sexos e não observaram diferença significativa das concentrações dessas bactérias quando compararam o grupo obeso com o grupo não obeso. Ressalta-se que Zuo et al (20) utilizou metodologia semelhante à do presente estudo e afirma que os métodos de cultura são indispensáveis para estudar a relação entre obesidade e bactérias do intestino.

A composição da microbiota intestinal é também influenciada por intervenções cirúrgicas e presença de diarreia, no presente estudo nenhuma das mulheres realizou cirurgia anterior no trato gastrointestinal e apenas quatro mulheres apresentaram quadro diarréico. Embora a idade das mulheres tenha apresentado diferença significativa entre os grupos, ambos os grupos eram composto por mulheres adultas, e durante a vida adulta a composição da microbiota intestinal ao nível de espécie é relativamente estável (21).

As bifidobactérias e os lactobacilos são bactérias que desempenham papel benéfico à saúde humana por reduzirem o pH por

meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta, inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (22). No presente estudo não foi observada diferença significativa nas concentrações de pH entre os grupos avaliados, com mediana de 6,9 em ambos os grupos, sendo esse pH favorável para o crescimento das bifidobactérias, as quais possuem um pH ótimo para crescimento de 6,0-7,0 (23). Entretanto, essa faixa não é favorável para o crescimento dos lactobacilos, uma vez que essas bactérias são acidúricas com pH ótimo para crescimento entre 5,5-6,2 (24)

Na população estudada encontrou-se diferença significativa nas concentrações plasmáticas de HDL-c, VLDL-c, triacilglicerol entre mulheres obesas e eutróficas, entretanto não houve associação dos parâmetros lipídicos com a microbiota intestinal.

A microbiota intestinal desempenha papel importante no metabolismo lipídico. Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal se relaciona com os lipídios no sangue têm sido propostos, dentre eles destaca-se que os ácidos graxos de cadeia curta, como o propionato e o acetato, produzidos a partir da fermentação bacteriana no cólon entram no fluxo sanguíneo para o fígado. O propionato diminui a síntese do colesterol por inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA). Além disso, o acetato é um precursor do acetil-CoA, enzima esta envolvida na lipogênese hepática. Como também, a conjugação dos ácidos biliares pela microbiota intestinal aumenta a excreção fecal de ácidos biliares que, por sua vez, aumenta a demanda de colesterol no fígado para a síntese de novos ácidos biliares, reduzindo assim as concentrações de colesterol do sangue (25). Como também, estudos têm verificado que o aumento da produção de triacilglicerol no fígado, pode estar associado com a redução da expressão da angiopoietina tipo 4 (5, 6).

No presente estudo as mulheres com obesidade mórbida apresentaram em média concentrações de colesterol total, LDL-c, VLDL-c e triacilglicerol na faixa da normalidade, fato este que pode ter contribuído para ausência de significância nas associações dos parâmetros lipídicos com as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*. Da mesma maneira no estudo de Teixeira et al (26), não foi encontrada correlação entre as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e as concentrações de colesterol total, LDL-c e triacilglicerol em mulheres obesas que apresentaram a mediana dessas frações na faixa da normalidade. Contudo, nesse estudo eles observaram uma correlação positiva entre HDL-c e *Bifidobacterium spp.* ( $r = 0,35$ ), fato esse não



observado em nosso estudo, apesar de ambos os estudos apresentarem concentrações de HDL-c abaixo do recomendado.

Em relação aos parâmetros glicêmicos, as concentrações plasmáticas de hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR, apresentaram diferenças significativas entre a população estudada, contudo não houve associação desses parâmetros com a microbiota intestinal.

A microbiota intestinal está associada com parâmetros glicêmicos, pois vários compostos derivados de micro-organismos estão relacionados com alterações da homeostase glicêmica dentre eles há os lipopolissacarídeo (LPS). O LPS, derivados da parede celular de bactérias gram-negativas, favorece a ocorrência da hiperglicemia e resistência à insulina (27). Pesquisas mostram que as concentrações plasmáticas de LPS estão associadas positivamente com a insulina e glicemia de jejum (28, 29). Além disso, os ácidos graxos de cadeia curta, principais produtos da fermentação das bactérias, ligam-se aos receptores acoplados à proteína (GPCRs), a Gpr41 e Gpr43, após sua absorção intestinal. Estes receptores são expressos em células epiteliais, no sistema endócrino e nos adipócitos (30). A estimulação destes receptores promove a secreção de peptídeos do intestino, GLP-1, GLP-2 e PYY, pelas células L intestinais, estes peptídeos atuam em vários órgãos, incluindo o trato gastrointestinal, cérebro, fígado e tecido adiposo, contribuindo assim para a melhoria da função da barreira intestinal e da homeostase da glicose (31).

As concentrações de lactobacilos e bifidobactérias das mulheres obesas foram semelhantes às mulheres eutróficas, o que sugere que as mulheres obesas talvez não apresentassem quadro de disbiose, e essa situação é capaz de melhorar a função da barreira intestinal, diminuindo a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana, acarretando diminuição nas concentrações plasmática de LPS. Além disso, a possível ausência de disbiose nas pacientes obesas faz com que o processo de fermentação aconteça de maneira adequada, e, por conseguinte, produção adequada das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (32, 33). Dessa forma, essas situações podem justificar o motivo da ausência de significância na associação entre as bifidobactérias e os lactobacilos, com os parâmetros glicêmicos. Ressalta-se também que as mulheres com obesidade mórbida apresentaram concentrações de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e insulina, na faixa da normalidade. Além disso, a utilização de

medicamentos hipoglicemiantes por 26% das mulheres obesas pode ter mascarado essa associação.

Em relação às limitações do estudo, deve-se considerar o desenho transversal do estudo, não sendo possível estabelecer relação de causa e efeito, tamanho amostral reduzido em decorrência da perda de 22% das mulheres elegíveis por não conseguirem evacuar antes da realização da cirurgia bariátrica. Como ponto forte destaca-se o cuidado metodológico e a relevância dos resultados encontrados para o meio científico.

Em conclusão as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp* são similares nos grupos estudados, como também não houve associação dessas bactérias com os parâmetros metabólicos. Resultados esses com possível influência do período de acompanhamento e orientações nutricionais, que antecedem a indicação da cirurgia. Não obstante, o presente estudo confere subsídio para a continuidade de estudos longitudinais que avaliem intervenções.

### **Agradecimentos**

Agradecimento ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio à execução do estudo e aos participantes do estudo.

### **Referências**

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization technical report series. 2000;894:i-xii, 1-253.
2. Conroy KP, Davidson IM, Warnock M. Pathogenic obesity and nutraceuticals. The Proceedings of the Nutrition Society. 2011;70(4):426-38.
3. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. Gastroenterology. 2007;132(6):2169-80.
4. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. Current opinion in pharmacology. 2009;9(6):737-43.
5. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(44):15718-23.

6. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(3):979-84.
7. 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):1027-31.
8. De Bandt JP, Waligora-Dupriet AJ, Butel MJ. Intestinal microbiota in inflammation and insulin resistance: relevance to humans. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(4):334-40.
9. Rickham PP. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *British medical journal*. 1964;2(5402):177.
10. WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva 2010.
11. Munoa FJ, Pares R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Applied and environmental microbiology*. 1988;54(7):1715-8.
12. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*. 1983;72(3):317-21.
13. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
14. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 1972;18(6):499-502.
15. ORGANIZATION. WWH. Expert committee on physical status: the use and interpretation of anthropometry. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. WHO technical report series, 854*. 1995.
16. ORGANIZATION. WH. BMI classification, Geneva, Switzerland: WHO, [2008]. Disponível em: <[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>. Acesso em: 16 jun. 2014. 2008.

17. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *The British journal of nutrition*. 2013;109 Suppl 2:S21-6.
18. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PG, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 2013;62(8):1112-21.
19. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
20. Zuo HJ, Xie ZM, Zhang WW, Li YR, Wang W, Ding XB, et al. Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(8):1076-81.
21. Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. Effect of overweight on gastrointestinal microbiology and immunology: correlation with blood biomarkers. *The British journal of nutrition*. 2010;103(7):1070-8.
22. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British journal of nutrition*. 2010;104 Suppl 2:S1-63.
23. Shah NP. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J*. 2007;17(11):1262-77.
24. Macedo LN, Luchese RH, Guerra AF, Barbosa CG. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2008;28:935-42.
25. Fava F, Lovegrove JA, Gitau R, Jackson KG, Tuohy KM. The gut microbiota and lipid metabolism: implications for human health and coronary heart disease. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(25):3005-21.
26. T FST, Grzeskowiak LM, Salminen S, Laitinen K, Bressan J, Gouveia Peluzio Mdo C. Faecal levels of *Bifidobacterium* and *Clostridium coccoides* but not plasma lipopolysaccharide are inversely related to insulin and HOMA index in women. *Clinical nutrition*. 2013;32(6):1017-22.
27. Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Current diabetes reports*. 2011;11(3):154-9.
28. Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, Singh K, et al. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity*. 2011;19(3):476-82.

29. 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.
30. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(5):483-90.
31. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(6):935-40.
32. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2013;69(1):75-86.
33. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.

Figura 1 – Fluxograma do recrutamento das participantes do estudo.

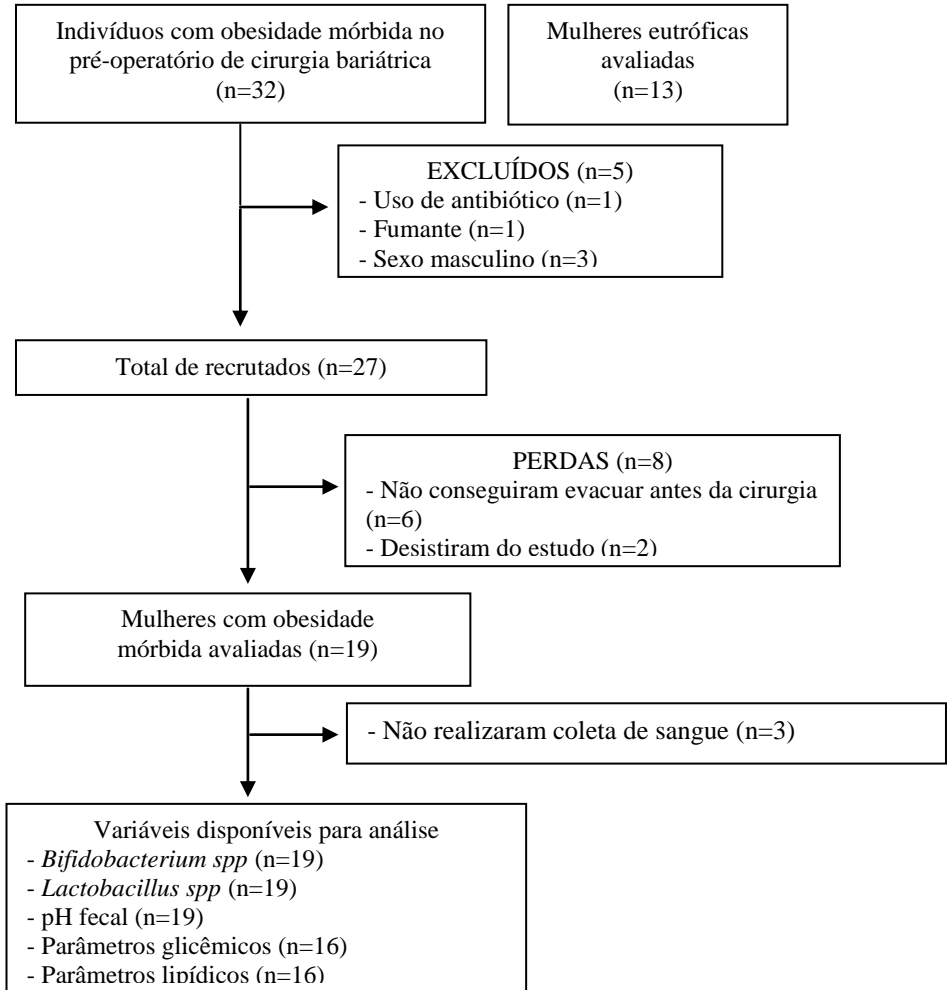


Tabela 1 – Caracterização das participantes do estudo. Florianópolis, 2014.

Características	Grupo obesas (n=19)	Grupo eutróficas (n=13)	Valor-p
Idade (anos)*	34 (31; 47)	26 (24; 27)	<0,001 <sup>+</sup>
Cor da pele (n, %)			
Branco	18 (95)	12 (92)	0,655 <sup>++</sup>
Não-branco	1 (5)	1 (8)	
Alterações gastrointestinais (n, %)	8 (42)	-	0,015 <sup>++</sup>
Presença	11 (58)	13 (100)	
Ausência			
Hábitos intestinais (%)			
4-7 vezes por semana	17 (89)	11 (85)	0,542 <sup>++</sup>
<4 vezes por semana	2 (11)	2 (15)	
Peso (kg)**	118,7 ± 14,3	57,3 ± 6,1	<0,001 <sup>+</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )**	45,8 ± 4,7	21,9 ± 2,1	<0,001 <sup>+</sup>

\*Dados em mediana e intervalo interquartil; \*\*Dados em média e desvio padrão; <sup>+</sup>Teste Mann-Whitney; <sup>++</sup> Teste de Fisher.

Tabela 2 – Comparação da microbiota intestinal e parâmetros metabólicos entre mulheres obesas e eutróficas. Florianópolis, 2014.

Parâmetros	Grupo obesas (n=19)	Grupo eutróficas (n=13)	Valor p
<i>Bifidobacterium spp</i> (UFC) <sup>***</sup>	14,7 (12,4; 18,1)	12,6 (12,1; 14,2)	0,199 <sup>+</sup>
<i>Lactobacillus spp</i> (UFC) <sup>**</sup>	16,8 ± 2,7	16,1 ± 2,2	0,435 <sup>++</sup>
pH fecal <sup>*</sup>	6,9 (6,6; 7,0)	6,9 (6,7; 7,1)	0,454 <sup>+</sup>
Colesterol total (mg/dL) <sup>**</sup>	175,4 ± 48,1 <sup>+</sup>	181,8 ± 31,1	0,679 <sup>++</sup>
LDL-c (mg/dL) <sup>**</sup>	110,8 ± 44,3 <sup>+</sup>	111,1 ± 24,3	0,878 <sup>+</sup>
HDL-c (mg/dL) <sup>**</sup>	36,4 ± 10,2 <sup>+</sup>	58,9 ± 15,4	<0,001 <sup>++</sup>
VLDL-c (mg/dL) <sup>*</sup>	29,3 (22,0; 36,7) <sup>+</sup>	15,2 (11,6; 20,4)	0,001 <sup>+</sup>
Triacilglicerol (mg/dL) <sup>*</sup>	146,5(111,5; 183,5) <sup>+</sup>	76,0 (58,0; 102,0)	0,001 <sup>+</sup>
Glicemia de jejum (mg/dL) <sup>*</sup>	90,0(79,0; 106,0) <sup>+</sup>	90,0(85,0; 91,0)	0,860 <sup>+</sup>
Hemoglobina glicada (%) <sup>*</sup>	5,7 (5,3; 6,0) <sup>+</sup>	5,1 (5,0; 5,3)	<0,001 <sup>+</sup>
Insulina (µIU/ml) <sup>**</sup>	20,0 ± 6,8 <sup>+</sup>	6,8 ± 4,2	<0,001 <sup>++</sup>
HOMA-IR <sup>**</sup>	4,7 ± 2,1 <sup>+</sup>	1,5 ± 0,9	<0,001 <sup>++</sup>

UFC: unidade formadora de colônias; LDL-c - lipoproteína de baixa densidade; HDL-c - lipoproteína de alta densidade; VLDL-c - lipoproteínas de densidade muito baixa; HOMA-IR: Homeostases Model Assessment - Insulin Resistance; <sup>+</sup>Variável com dados ignorados; \*Mediana e intervalo interquartil; \*\* Média e desvio padrão; \*\*\* Dados apresentados em Log<sub>10</sub>.  
<sup>+</sup>Teste Mann-Whitney; <sup>++</sup> Teste T.

Tabela 3 – Análise bivariada de associações entre contagem de *Bifidobacterium spp* e parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida (n=16). Florianópolis, 2014.

Parâmetros Metabólicos	Bifidobacterium spp			Valor p
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	
Colesterol total (mg/dL) <sup>+</sup>	165,0 ± 63,4	203,8 ± 49,2	166,8 ± 24,6	0,423 <sup>*</sup>
LDL-c (mg/dL) <sup>+</sup>	110,3 ± 54,9	140,2 ± 27,3	91,5 ± 36,0	0,247 <sup>*</sup>
HDL-c (mg/dL) <sup>+</sup>	32,8 ± 6,2	36,8 ± 9,4	39,8 ± 13,8	0,246 <sup>*</sup>
VLDL-c (mg/dL) <sup>++</sup>	31,8 (22,6; 45,2)	30,7 (22,8; 39,2)	27,2 (22,0; 32,6)	0,432 <sup>***</sup>
Triacilglicerol (mg/dL) <sup>++</sup>	159,0 (113,0; 226,0)	153,5 (114,0; 196,0)	136,0 (110,0; 163,0)	0,432 <sup>***</sup>
Glicemia de jejum (mg/dL) <sup>++</sup>	100,0 (79,0; 122,0)	84,5 (80,0; 92,5)	88,0 (79,0; 105,0)	0,572 <sup>**</sup>
Hemoglobina glicada (%) <sup>++</sup>	5,9 (5,6; 7,4)	5,6 (5,2; 6,0)	5,5 (5,3; 6,0)	0,260 <sup>***</sup>
Insulina (μIU/ml) <sup>+</sup>	19,1 ± 8,9	19,5 ± 5,0	21,3 ± 6,5	0,597 <sup>*</sup>
HOMA-IR <sup>+</sup>	5,3 ± 3,3	4,2 ± 1,3	4,6 ± 1,0	0,589 <sup>*</sup>

LDL-c - lipoproteína de baixa densidade; HDL-c – lipoproteína de alta densidade; VLDL-c - lipoproteínas de densidade muito baixa; HOMA-IR - Homeostases Model Assessment – Insulin Resistance; <sup>+</sup> Média e desvio padrão; <sup>++</sup> Mediana e intervalo interquartil; <sup>\*</sup>Teste de ANOVA de heterogeneidade; <sup>\*\*</sup>Teste de ANOVA de Tendência; <sup>\*\*\*</sup>Teste de Kruskal-Wallis; <sup>\*\*\*\*</sup> Teste de tendência para dados não paramétricos.



Tabela 4 – Análise bivariada de associação entre contagem de *Lactobacillus spp* e parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida (n=16). Florianópolis, 2014.

Parâmetros Metabólicos	Lactobacillus spp			Valor p
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	
Colesterol total (mg/dL) <sup>+</sup>	176,6 ± 58,0	162,8 ± 43,0	186,4 ± 47,6	0,764*
LDL-c (mg/dL) <sup>+</sup>	122,8 ± 51,4	111,6 ± 37,2	95,4 ± 46,7	0,777*
HDL-c (mg/dL) <sup>+</sup>	33,5 ± 6,4	33,2 ± 9,0	43,2 ± 13,2	0,209*
VLDL-c (mg/dL) <sup>++</sup>	28,3 (22,6; 45,2)	25,8 (20,0; 30,0)	32,6 (28,6; 35,0)	0,363**
Triacilglicerol (mg/dL) <sup>++</sup>	141,5 (113,0; 226,0)	129,0 (100,0; 150,0)	163,0 (143,0; 175,0)	0,363**
Glicemia de jejum (mg/dL) <sup>++</sup>	90,0 (90,0; 91,0)	88,0 (84,0; 92,0)	86,5 (86,0; 87,0)	0,573***
Hemoglobina glicada (%) <sup>++</sup>	5,7 (5,4; 6,0)	5,3 (5,2; 5,8)	6,0 (5,6; 6,1)	0,523**
Insulina (µIU/ml) <sup>+</sup>	22,5 ± 7,8	17,0 ± 6,4	20,0 ± 5,9	0,432*
HOMA-IR <sup>+</sup>	5,2 ± 2,4	4,3 ± 2,8	4,6 ± 1,0	0,785*

LDL-c - lipoproteína de baixa densidade; HDL-c – lipoproteína de alta densidade; VLDL-c - lipoproteínas de densidade muito baixa; HOMA-IR - Homeostases Model Assessment – Insulin Resistance; <sup>+</sup> Média e desvio padrão; <sup>++</sup> Mediana e intervalo interquartil; \*Teste de ANOVA de heterogeneidade; \*\*Teste de ANOVA de Tendência; \*\*\*Teste de Kruskal-Wallis; \*\*\*\* Teste de tendência para dados não paramétricos.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo é a primeira fase de um projeto maior que pretende avaliar o efeito da suplementação de prebiótico e simbiótico na microbiota intestinal e nos parâmetros metabólicos após a derivação gástrica em Y de Roux. Nesta fase objetiva-se avaliar as concentrações de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, pH fecal, parâmetros glicêmicos, HOMA-IR e parâmetros lipídicos, em mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica, bem como, avaliar associação da concentrações de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, com os parâmetros metabólicos. Dentre os principais resultados encontrados, destacam-se:

a) As concentrações fecais de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, e pH fecal não apresentaram diferenças significativas entre as mulheres com obesidade mórbida e as mulheres eutróficas;

b) Mulheres com obesidade mórbida apresentaram valores de VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR superiores às mulheres eutróficas, não houve diferença entre os grupos em relação a colesterol total, LDL-c e glicemia de jejum;

c) Embora sem significância estatística, mulheres com obesidade mórbida apresentaram maiores concentrações de HDL-c e menores concentrações de VLDL-c, triacilglicerol, hemoglobina glicada e HOMA-IR quando as concentrações de *Bifidobacterium spp.* foram maiores;

d) Mulheres com obesidade mórbida tinham concentrações de LDL-c menores quando houve uma maior concentração de *Lactobacillus spp.*, contudo essa modificação não foi estaticamente significativa;

Esses resultados ressaltam a importância da avaliação da microbiota intestinal de indivíduos obesos mórbidos gera uma perspectiva de melhora dessa microbiota intestinal após o tratamento pós-cirúrgico, como também conferem subsídios para a elaboração de estudos que avaliem intervenções destinadas à mudança da microbiota intestinal e possível melhoras nos parâmetros metabólicos.



## **7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Em relação às limitações do estudo, deve-se considerar o desenho transversal do estudo, não sendo possível afirmar se a exposição precedeu o desfecho. O tamanho amostral definido por meio do método não probabilístico por conveniência também apresenta limitações visto que os resultados encontrados no estudo não podem ser expandidos para a população, como também o tamanho amostral reduzido em decorrência da perda de 22% das mulheres elegíveis por não conseguirem evacuar antes da realização da cirurgia bariátrica.



## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.B. et al. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.24, n.1, p.58-65, 2009.

ALONSO, R. V.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **The british journal of nutrition**, v.109, n.1, p. s21-s23, 2013. Suplemento 2.

ARON-WISNEWSKY, J.; DORÉ, J.; CLEMENT, K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. **Nature reviews gastroenterology e hepatology**, v.10, n.9, p. 590-598, 2012.

ABESO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA (). **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010**. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009. 85 p., 2009.

BACKHED, F, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the national academy of sciences united states of america**, v. 104, n.3, p.979-984, 2007.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the national academy of sciences united states of america**, v.101, n.44, p. 15718-15723, 2004.

BACKHED, F. Programming of Host Metabolism by the Gut Microbiota. **Annal of nutrition & metabolism**, v. 58, n. 1, p. 44-52, 2011. Suplemento 2.

BANDT, J.P; DUPRIET, W.A.J.; BUTEL, M. J. Intestinal microbiota in inflammation and insulin resistance: relevance to humans. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.14, n.4, p.334-340, 2011.

BASU, S. et al. Pre-gravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. **Obesity (Silver Spring)**, v.19, n.3, p. 476-482, 2011.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. **International journal of food microbiology**, v.126, n.3, p. 278-285, 2008.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 13 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1966, 991p.

BLAUT, M.; KLAUS, S. Intestinal Microbiota and Obesity. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 209, n.1, p. 251-273, 2012.

BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. **The american journal of clinical nutrition**, v.78, n.4, p.675-683, 2003.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**, v.28, n.2, p.117-127, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Glossário Temático Alimentação e Nutrição. Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2007.

CAMILLERI, M. Probiotics and Irritable Bowel Syndrome: Rationale, Putative Mechanisms, and Evidence of Clinical Efficacy. **Journal of clinical gastroenterology**, v.40, n.3, p. 264-269, 2006.

CANI, P.D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v.58, n.8, p.1091-1103, 2009.

CANI, P.D et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v.50, n.11, p.2374-2383, 2007.



CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current opinion in pharmacology**, v.9, n.6, p.737-743, 2009.

CANI, P.D.; EVERARD, A.; DUPARC, T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. **Current opinion in pharmacology**, v.13, n.6, p.935-940, 2013.

CARICILLI, A.M.; SAAD, M.J. The role of gut microbiota and insulin resistance. **Nutrients**, v.5, n.3, p. 829-851, 2013.

CARLISLE, E.M.; MOROWITZ, M.J. Pediatric surgery and the human microbiome. **Journal of Pediatric Surgery**, v.46, n.4, p. 577-584, 2010.

CLAESSON, M.J.; SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. The genus *Lactobacillus*--a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology letters**, v.269, n.1, p.22-28, 2007.

CONROY, K.P.; DAVIDSON, I.M.; WARNOCK, M. Pathogenic obesity and nutraceuticals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.70, n.4, p. 426-438, 2011.

CONNOR, O.E.M. The role of gut microbiota in nutritional status. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.16, n.5, p.509-516, 2013.

CREELY, S.J. et al Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.292, n.3, p. E740-E747, 2007.

CUMMINGS J.H, MACFARLANE G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **The journal of applied bacteriology**, v.70, n.6, p.443-459, 1991.

DELZENNE, N.M.; CANI, P.D. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. **Current diabetes reports**, v.11, n.3, p. 154-159, 2011.

DEWULF, E.M. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. **Gut**, v.62, n.8, p.1112-1121, 2013.

DIAMANT, M.; BLAAK, E.E.; VOS, W.M. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? **Obesity Review**, v.12, n.4, p. 272-281, 2011.

DIBAISE, J.K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, n.4, p.460-469, 2008.

DUNCAN, S.H. et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International journal of obesity**, v.32, n.11, p.1720-1724, 2008.

EJTAHED, et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of dairy science**, v.94, n.7, p.3288-3294, 2011.

ESTEVE, E.; RICART, W.; REAL, F.J.M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.14, n.5, p.483-490, 2011.

FAVA, F. et al. The Gut Microbiota and Lipid Metabolism: Implications for Human Health and Coronary Heart Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n.25, p.3005-3021, 2006.

FLOCK, M.R.; GREEN, M.H.; KRIS-ETHERTON, P.M. Effects of Adiposity on Plasma Lipid Response to Reductions in Dietary Saturated Fatty Acids and Cholesterol. **Advances in Nutrition**, v.2, n.3, p.261-274, 2011

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

FUKIYA, S. et al. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. **FEMS Microbiology Letters**, v.293, n.2, p. 263-270, 2009.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of the nutrition**, v.25, n.6, p.1401-1412, 1995.

GUARNER .F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.9356, n.361, p. 512-529, 2003.

HARRIS, K. et al. Is the gut microbiota anew factor contributing to obesity and its metabolic disorders? **Journal of Obesity**, 2012.  
doi:10.1155/2012/879151

HAUB, S. Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v.298, n.3, p.298-303, 2010.

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v.9, n.2, p.180-197, 2004.

IBGE.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Pesquisa de orçamentos familiares. **Antropometria e análise do estado nutricional de crianças, adolescentes e adulto Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American journal of clinical**, v.94, n.1, p. 58-65, 2011.

KINROSS, J.M. et al. The human gut microbiome: implications for future health care. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, n.4, p.396-403, 2008.

KRAJMALNIK-BROWN, R. et al. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. **Nutrition in Clinical Practice**, v.27, n.2, p.201-214, 2012

LARSEN, N. et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PloS One**, v.5, n.2, p. e9085, 2010.

LEY, R.E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v.21, p. 1022-1023, 2006.

MACEDO, L. N. et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciências e tecnologia de alimentos**, v.28, n.4, p.935-942, 2008.

MAI, V.; DRAGANOV, P.V. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, n. 1, p.81-85, 2009.

MAKIVUOKKO, H. et al. Association between the ABO blood group and the human intestinal microbiota composition. **Microbiology**, v.6, n.1, p.12-94, 2012.

MARCHESI, J.R. Human distal gut microbiome. **Environmental Microbiology**, v.13, n.12, p.3088-3102, 2011.

MARTÍNEZ, I. et al. Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.2, p. 516-524, 2013a.

MARTÍNEZ, I. et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. **The ISME Journal**, v.7, n.2, p. 269-280, 2013b.

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

MORREIRA, B. et al. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutrición Hospitalaria**, v.27, n.5, p. 1408-1414, 2012.

MUÑOZA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *bifidobacterium* spp. **Applied and environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1715-1718, 1988.

MUNUKKA, E. et al. Women With and Without Metabolic Disorder Differ in Their Gut Microbiota Composition. **Obesity**, v.20, n.5, p.1082-1087, 2012.

MUSSO, G.; GAMBINO, R; CASSADER, M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? **Diabetes Care**, v.33, n.10, p. 2277-2284, 2010.

ORBAN, J.I.; PATTERSON, J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobactérias. **Journal microbiology methods**, v. 40, p. 221-224, 2000.

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

POKUSAeva, K.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genes nutrition**, v.6, n.1, p. 285-306, 2011.

RABOT, S. et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. **FASEB Journal**, v.24, n.12, p. 4948-4959, 2010.

RICKHAM, P.P. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. **British medical journal**. v.2, n.5402, p.177, 1964.

RIEDEL, C.U. Anti-inflammatory effects of bifidobactérias by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.33, p. 3729-3735, 2006.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British journal of nutrition**. v.104, n.1, p. 1-63, 2010. Suplemento 2.

SAMUEL, B. S. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **Proceedings of the national academy of sciences united states of america**, v.105, n.43, p. 16767–16772, 2008.

SANTACRUZ, A. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **The British Journal of Nutrition**, v.104, n.1, p. 83-92, 2010.

SAVARD, P. et al. Impact of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and, Lactobacillus acidophilus LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International journal of food microbiology**, v.149, n.1, p.50-57, 2011.

SBCBM – SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA. **Técnicas cirúrgicas**. Disponível em: <<http://www.sbcm.org.br/cbariatrica.asp?menu=1>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

SCARDOVI, V. **Genus Bifidobacterium**. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1418-1434, 1986.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological reviews**, v.90, n.3, p. 859-904, 2010.

SHAH, N. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n.1, p. 1261-1277, 2007.

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

SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The journal of clinical endocrinology e metabolism**, v.92, n.3, p.1023-1033, 2007.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v.5, n.4, p.1417-1435, 2013

SOMMER, F.; BACKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. **Nature reviews microbiology**, v.11, n.4, p.227-238, 2013.

SUN, L. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy. **Diabetes Care**, v.33, n.9, p. 1925-1932, 2010.

TANNOCK, G.W. The bifidobacterial and Lactobacillus microflora of humans. **Clinical reviews in allergy e immunology**, v.22, n.3, p. 232-253, 2002.

TAP, J. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental microbiology**, v.11, n.10, p.2574-2584, 2009.

TAPPENDEN, K.A, DEUTSCH, A.S. The physiological relevance of the intestinal microbiota--contributions to human health. **Journal of the American college of nutrition**, v.26, n.6, p.679S-683S, 2007.

TASSELL, M.V.; MILLER, M.J. Lactobacillus Adhesion to Mucus. **Nutrients**, v. 3, n.1, p.613-636, 2011.

TEIXEIRA, F.S. et al, Faecal levels of Bifidobacterium and Clostridium coccoides but not plasma lipopolysaccharide are inversely related to insulin and HOMA index in women. **Clinical Nutrition**, v.32, n.06, p. 1017-1022, 2013.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A.C.; RAUTONEN, N. Effect of overweight on gastrointestinal microbiology and immunology: correlation with blood biomarkers. **The British journal of nutrition**, v.103, n.7, p.1070-1078, 2010.

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

TURNBAUGH, P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n.1, p. 1027–1031, 2006.

TURNBAUGH, P.J.A. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v.457, n.7228, p. 480-484, 2009.

TURRONI, F.; SINDEREN, D.V.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, n.1, p. 37-44, 2011.

VAN DEN BROEK, L.A.M. et al. *Bifidobacterium* carbohydrases their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. **Molecular nutrition e food research**, v. 52, n.1, p. 146-163, 2008.

VÉLEZ, M.P.; KEERSMAECKER, S.C.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology letters**, v.276, n.2, p.140-148, 2007.

VIGITEL. VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. **Excesso de peso e obesidade**. Brasília, 2012.

VOROBJEVA, N.V. Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water. **Medical Hypotheses**, v.64, n.1, p.543-546, 2005.

VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Advances in biochemical engineering**, v.111, n.1, p.1-66, 2008.

VRIEZE, A. et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. **Gastroenterology**, v.143, n.4, p.913-916, 2012.

WALKER, A.W.; LAWLEY, T.D. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**. V.69, n.1, p.75-86, 2013.



WONG, J.N.W. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal Clinical Gastroenterology**. v.40, n.3, p.235-43, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **BMI classification**, Geneva, Switzerland: WHO, [2008]. Disponível em: <[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>. Acesso em: 16 jun. 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on physical status: the use and interpretation of anthropometry. Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. **WHO technical report series**, 854. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global recommendations on physical activity for health. Geneva: WHO, 2010a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. WHO, 2010b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International guide for monitoring alcohol consumption and related harm. Geneva: WHO, 2000b.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Geneva, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report, n° 894. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: WHO, 2000a.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature medicine**, v.8, n.11, p.1288-1295, 2002.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v. 72, p. 317, 1983.

ZIEMER, C.J.; GIBSON G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, n.1, p.473-479, 1998.

ZUO, H.J. et al. Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. **World journal of gastroenterology**, v.17, n.8, p.1076-1081, 2011.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Senhor(a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica resultante de parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU). Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família, para que a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Caso aceite fazer parte do estudo assine ao final deste documento (nas duas vias). Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**1. Instituição sede da pesquisa:** Departamento de Nutrição (NTR) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) no Campus Trindade (Florianópolis-SC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Telefone fixo: (48) 3721-9784 (ramal 23).

**2. Título do projeto:** Efeito da suplementação de prebiótico e simbiótico sobre marcadores inflamatórios, perfil celular de ácidos graxos e microbiota intestinal, antes e após a cirurgia bariátrica.

**3. Pesquisador responsável:** Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade.

**4. Garantia de informação e desistência:** O(A) Senhor(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer ponto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação, a qualquer momento. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, não haverá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao seu tratamento e aos cuidados que tenha direito a receber.

**5. Descrição do estudo:** A pesquisa acontecerá no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, localizado no Campus Universitário, município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. Serão convidados a participar do estudo pessoas com diagnóstico de

obesidade que realizarão a cirurgia bariátrica e metabólica neste hospital ou que tenham indicação de realizar a cirurgia. Adicionalmente, serão convidados a participar dessa pesquisa indivíduos sem diagnóstico de obesidade (eutrófico) e nenhuma comorbidade associada que caracterizará o grupo controle. Neste estudo, pretende-se avaliar se a suplementação de prebiótico ou simbiótico antes e após a cirurgia bariátrica e metabólica apresenta benefícios à saúde humana. Prebióticos são produtos alimentares não digeridos pelo corpo e que estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino. Probióticos são micróbios vivos (ou bactérias vivas) que, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem benefícios à saúde humana. Essas bactérias são consideradas seguras para o consumo, desde que consumidas na dose correta. Já os simbióticos são produtos que contêm tanto prebióticos quanto probióticos. Entre os benefícios que estes suplementos podem trazer, destaca-se a melhora da saúde do intestino e a melhora da defesa do organismo, além de auxiliar na perda de peso. Apesar disso, é importante destacar que todos estes benefícios foram observados em indivíduos sem obesidade ou com outras doenças. Em seres humanos com obesidade, ainda existe dúvida se estes suplementos podem trazer todos estes benefícios, tanto antes quanto após a cirurgia bariátrica e metabólica. Assim, o resultado da pesquisa pode trazer informações importantes para indivíduos que realizaram a cirurgia bariátrica e metabólica ou que a realizarão no futuro.

Caso aceite participar, serão coletados: dados do prontuário; peso e altura; amostras de sangue para avaliação em laboratório e amostras de fezes para avaliação da microbiota intestinal. Microbiota intestinal refere-se ao conjunto de bactérias presentes no intestino do ser humano, ajudando no bom funcionamento do mesmo.

- Para os indivíduos que estiverem internados e realizarem a cirurgia bariátrica e metabólica: as avaliações serão feitas em três momentos: imediatamente antes de iniciar a cirurgia bariátrica, 30 e 45 dias após a cirurgia. Estes indivíduos serão distribuídos em três grupos, sendo que os mesmos serão orientados a ingerir suplemento nutricional de prebiótico (grupo prebiótico) ou simbiótico (grupo simbiótico) ou maltodextrina (grupo placebo) na quantidade de 6 gramas por dia. A ingestão dos suplementos terá duração de 15 dias, e será iniciada após completar 30 dias de cirurgia.

- Para os indivíduos que estiverem apenas em acompanhamento no Ambulatório de Nutrição e Cirurgia Bariátrica e Metabólica, as avaliações também serão realizadas em três momentos: na primeira

consulta, 15 e 30 dias após a primeira consulta. Estes indivíduos também serão distribuídos em três grupos, sendo que os mesmos serão orientados a ingerir suplemento nutricional de prebiótico (grupo prebiótico) ou simbiótico (grupo simbiótico) ou maltodextrina (grupo placebo) na quantidade de 6 gramas por dia. A ingestão dos suplementos terá duração de 30 dias, e será iniciada logo após a primeira consulta no respectivo ambulatório.

- Para os indivíduos do grupo controle sem obesidade, as avaliações serão realizadas em dois momentos: no momento pré-suplementação e quinze dias após suplementação

É importante esclarecer que haverá uso de placebo (substância inativa). Neste estudo, o placebo que será utilizado é a maltodextrina, um produto alimentar proveniente do amido de milho. A suplementação com placebo é necessária para verificar se a suplementação de prebiótico ou simbiótico traz benefícios à saúde de indivíduos obesos, antes e após a cirurgia bariátrica e metabólica, comparado aos indivíduos que são suplementados com uma substância inativa.

A distribuição dos participantes do estudo para um dos grupos será realizada por sorteio e o(a) Senhor(a) não poderá escolher qual dos grupos quer fazer parte. Durante o período da pesquisa, nem o(a) Senhor(a), nem os pesquisadores terão conhecimento de qual grupo o(a) Senhor(a) fará parte. Apenas ao término do estudo será revelado em qual grupo o(a) Senhor(a) se encontrava. Em todos os momentos do estudo será necessário que o(a) Senhor(a) forneça 20 mL de sangue (totalizando 60 mL na soma dos três momentos) que serão coletados pela equipe do laboratório de análises clínicas do HU. Também será necessário que o(a) Senhor(a) forneça uma pequena quantidade de fezes (um grama) que será coletado pelo Senhor(a) em um pote plástico e transferidos para um saco plástico especial fornecido pelos pesquisadores, sem custos financeiros para o(a) Senhor(a). Essas amostras de sangue e fezes serão usadas para dosagem de substâncias e células que servirão de indicadores para os possíveis efeitos do prebiótico e simbiótico. Além disso, haverá contatos telefônicos uma vez por semana, a fim de acompanhar o andamento do estudo.

Caso o(a) Senhor(a) não aceite a suplementação, solicito a utilização dos dados do seu prontuário. Reafirmo o compromisso ético da não-violação destas informações.

**6. Riscos e desconfortos:** Os efeitos prejudiciais decorrentes da suplementação de prebiótico e simbióticos não são frequentes,

entretanto, pode ocorrer aumento de gases, náuseas, dor na barriga e infecções. Entretanto, estudos em indivíduos sem obesidade ou que realizaram cirurgias semelhantes à cirurgia bariátrica e metabólica, não apresentaram efeitos prejudiciais à saúde humana após a suplementação dessas substâncias. Caso o(a) Senhor(a) aceite participar do estudo e ocorra algum desconforto após o início da suplementação, favor interromper o consumo e entrar em contato com os pesquisadores. *Importante: Se você for alérgico a prebiótico e/ou simbiótico e/ou maltodextrina, NÃO aceite participar do estudo.* No que diz respeito à coleta de sangue, pode existir desconforto decorrente da entrada da agulha e retirada do sangue. Com relação à coleta de peso e altura e à coleta de fezes, o estudo não prevê riscos.

**7. Benefícios:** Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto (financeiro, por exemplo). Entretanto, esperamos que este estudo contribua com informações importantes à ciência. Os resultados podem trazer benefícios a todos os seres humanos obesos que forem submetidos à cirurgia bariátrica e metabólica.

**8. Custos:** O(a) Senhor(a) não terá nenhum gasto com a pesquisa, uma vez que os procedimentos serão feitos na própria instituição onde é realizado o tratamento da doença, e os materiais para coleta de fezes e suplementos serão doados pelo pesquisador.

### **9. Esclarecimentos e dúvidas:**

Se o(a) Senhor(a) tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato com o pesquisador responsável, Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, com a Prof. Dra. Marilyn Gonçalves Ferreira Kuntz ou com os mestrandos Ricardo Fernandes e Bruna Teles Soares Beserra pelos seguinte meios: telefone fixo: (48) 3721-9784 (ramal 23); telefone celular: (48) 9615-6587 / 9101-9228 / 9997-9941 / 9621-2336; e-mail: [erasmotrindade@gmail.com](mailto:erasmotrindade@gmail.com) / [mgfknutri@yahoo.com.br](mailto:mgfknutri@yahoo.com.br) / [ricardontr@gmail.com](mailto:ricardontr@gmail.com) / [brunna\\_telless@hotmail.com](mailto:brunna_telless@hotmail.com)

Se o(a) Senhor(a) estiver de acordo em participar do estudo, garantimos que as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho com a finalidade de gerar conhecimento em saúde. Os pesquisadores têm o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

CONSENTIMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA

Eu .....,  
portador do RG: ..... Fone para  
contato:.....concordo de maneira livre e esclarecida  
em participar da pesquisa: **Efeito da suplementação de prebiótico e  
simbiótico sobre marcadores inflamatórios, perfil celular de ácidos  
graxos e microbiota intestinal, antes e após a cirurgia bariátrica.**  
Além de ter lido e entendido todas as informações fornecidas sobre  
minha participação na pesquisa, tive oportunidade de discuti-las e fazer  
perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas  
satisfatoriamente. Foi-me garantido que posso retirar meu  
consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer  
penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou  
tratamento.

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Erasmo B. S. M. Trindade

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilyn G. F. Kuntz

\_\_\_\_\_  
Ricardo Fernandes

\_\_\_\_\_  
Bruna Teles Soares Beserra

## APÊNDICE B – Caracterização dos indivíduos

### Caracterização dos indivíduos

Nº prontuário HU/UFSC: \_\_\_\_\_ Nº identificação na pesquisa: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Procedência/Endereço: \_\_\_\_\_

Cor da pele: ( ) Branco ( ) Não Branco

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



**APÊNDICE C – Avaliação da microbiota intestinal, laboratorial, antropométrica e parâmetros clínicos.**

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL**

<b>Bactérias</b>	
Nº de <i>Bifidobacterium spp.</i>	
Nº de <i>Lactobacillus spp.</i>	
pH fecal	

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL**

<b>Marcador</b>	
Insulina (ng/mL)	
Glicemia de jejum (mg/dL)	
HOMA-IR	
HbA <sub>1C</sub> (%)	
Colesterol total (mg/dL)	
HDL-c (mg/dL)	
LDL-c (mg/dL)	
VLDL-c (mg/dL)	
Triglicerídeos (mg/dL)	

**AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA**

<b>Marcador</b>	
Altura	
Peso atual	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	
Classificação	

**PARÂMETROS CLÍNICOS**

Comorbidades associadas:
Fármacos utilizados:
Hábitos intestinais: ( ) Diariamente ( ) 4-6 vezes por semana ( ) < 4 vezes por semana.
Alterações gastrointestinais: ( ) Não ( ) Sim Quais:
Intervenção cirúrgica anterior no trato gastrointestinal: ( ) Não ( ) Sim Quais:

## APÊNDICE D - Nota de Imprensa

### **Avaliação da Microbiota Intestinal e sua Relação com Parâmetros Metabólicos em Mulheres com Obesidade Mórbida**

A obesidade é um dos problemas de saúde pública que mais cresce no mundo, a ponto de ser considerada uma epidemia global. De acordo com a *World Health Organization* a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, representando um problema de abrangência mundial. Além dos fatores comumente envolvidos nas disfunções metabólicas presentes no indivíduo obeso, a microbiota intestinal pode estar relacionada com a patogênese e a progressão da obesidade, particularmente na regulação de energia e no armazenamento de gordura

Ressalta-se, que na obesidade o acúmulo de tecido adiposo leva à produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de um quadro de inflamação crônica, podendo interferir em várias vias metabólicas do organismo, tais como a via de sinalização de insulina, o que pode alterar a homeostase glicêmica e culminar com o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2, bem como alterações no perfil lipídico, resultando em dislipidemia. Alterações dessas vias metabólicas pela obesidade podem estar relacionadas com a microbiota intestinal.

Desta forma, a nutricionista e mestrandia Bruna Teles Soares Beserra, do programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação do Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, e a colaboração da professora Dr<sup>a</sup> Flávia Martinello, realizou estudo para avaliar as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* e associá-las com os parâmetros metabólicos, em mulheres com obesidade mórbida. A pesquisa foi realizada no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no período de outubro de 2013 a abril de 2014 e incluiu 19 mulheres com obesidade mórbida no pré-operatório de cirurgia bariátrica e 13 mulheres eutróficas.

Como resultado, esse estudo mostrou que as concentrações de *Bifidobacterium spp.* e de *Lactobacillus spp.* das mulheres obesas não diferiram das mulheres eutróficas. Como também que as concentrações dessas bactérias nas mulheres com obesidade mórbida, não estão associadas com os parâmetros glicêmicos e lipídicos. Esses resultados

ressaltam a importância de avaliar a microbiota intestinal de indivíduos obesos mórbidos no pré-operatório da cirurgia bariátrica, visando uma melhora no tratamento pós-cirúrgico.

Portanto, pretende-se dar sequência a essa pesquisa suplementando as mulheres com obesidade mórbida recrutadas com prebiótico ou simbiótico após a cirurgia bariátrica, e avaliar o efeito dessa suplementação nos parâmetros previamente descritos, buscando dessa maneira intervenções que melhorem a microbiota intestinal após o tratamento cirúrgico.

Mais informações podem ser solicitadas pelos e-mails: [brunna\\_telless@hotmail.com](mailto:brunna_telless@hotmail.com) ou [erasmotrindade@gmail.com](mailto:erasmotrindade@gmail.com).



## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS ANTES E APÓS À CIRURGIA BARIÁTRICA

**Pesquisador:** Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13778413.1.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 245.650

**Data da Relatoria:** 08/04/2013

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, considera-se que as pendências foram resolvidas e recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 15 de Abril de 2013

---

Assinador por:  
Andréa Ferreira Delgado  
(Coordenador)