

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E METABOLISMO

FABIANA TANNIÃO FOLCONI

Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2

RIBEIRÃO PRETO

2023

FABIANA TANNIHÃO FOLCONI

Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2

Versão Corrigida.

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutora em Nutrição e Metabolismo.

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo.

Orientadora: Profa. Dr. Maria Cristina Foss-Freitas

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Folconi, Fabiana Tannahão

Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2. Ribeirão Preto, 2023.

71 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Palavras-chave: diabetes tipo 2. probióticos. microbiota intestinal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabiana Tannahão Folconi

Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Nutrição e Metabolismo.

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me proporcionou a vida e sempre me deu forças para seguir em frente.

À professora Dra. Maria Cristina Foss-Freitas pela contribuição para o meu crescimento científico e intelectual durante todo esse tempo e também pelo incentivo e disponibilidade em me auxiliar na reta final do trabalho.

Ao professor Dr. Anderson Marliere Navarro por me oferecer apoio em um momento que eu estava desanimada com o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, em especial, à Maria Aparecida Nunes Ferreira pela ajuda na realização dos experimentos e ao professor Dr. Marco Andrey Cipriani Frade por compartilhar o espaço e os materiais para as análises.

Agradeço à professora Dra. Daniela Carlos Sartori, por compartilhar seu amplo conhecimento em microbiota e também ao Jhefferson Barbosa Guimarães, que desenvolveu todo o experimento comigo.

Agradeço ao professor Dr. Sergio Luiz de Souza Salvador, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por disponibilizar o material necessário para iniciarmos a pesquisa.

Agradeço também à professora Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto e professor Dr. Michel Reis Messoria, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela parceria de trabalho com probióticos.

Aos meus pais, familiares e amigos, por me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu esposo, por segurar minha mão nos momentos que me senti fragilizada.

Por fim, todos os participantes, que gentilmente aceitaram participar da pesquisa.

Sem os poucos, nada seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

FOLCONI, F. T. **Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2.** Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por hiperglicemia. Estudos vêm demonstrando uma relação importante entre o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) e a microbiota intestinal. A microbiota é um ecossistema complexo e abundante, composto por microrganismos que vivem de forma simbiótica no trato gastrointestinal humano. A eubiose perturbada dos filos de bactérias desencadeia respostas inflamatórias subsequentes características do DM2. A suplementação com probiótico tem apresentado efeitos benéficos sobre parâmetros metabólicos em indivíduos com DM2. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) no controle metabólico, microbiota intestinal e resposta imunológica de indivíduos com DM2. Oito indivíduos com DM2 receberam *B. lactis* HN019 ou placebo por 12 semanas. Amostras de sangue foram coletadas para avaliar perfil glicêmico e lipídico, e também para determinação da resposta imunológica por meio das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ . Amostras de fezes foram utilizadas para determinação da abundância relativa de gêneros bacterianos dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia. O consumo do probiótico *B. lactis* HN019 por indivíduos com DM2 durante 12 semanas foi capaz de reduzir os níveis da citocina IFN- γ , associado a um aumento de bactérias do filo Verrucomicrobia e Firmicutes. Além de ter sido observada uma redução de aproximadamente 11% do teor de carboidratos em relação ao valor calórico total diário. São necessárias mais pesquisas, a fim de aumentar o tamanho da amostra para que forneçam evidências mais fortes em relação ao consumo de probióticos em condições de diabetes.

PALAVRAS-CHAVE: diabetes tipo 2, probióticos, microbiota intestinal

ABSTRACT

FOLCONI, F. T. **Evaluation of the effect of consuming *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 on metabolic control, intestinal microbiota and immunological response in individuals with type 2 diabetes.** Doctoral thesis – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia. Studies have demonstrated an important relationship between the development of type 2 diabetes (T2D) and the intestinal microbiota. The microbiota is a complex and abundant ecosystem, composed of microorganisms that live symbiotically in the human gastrointestinal tract. Disturbed eubiosis of bacterial phyla triggers subsequent inflammatory responses characteristic of T2D. Probiotic supplementation has shown beneficial effects on metabolic parameters in individuals with T2D. Therefore, the objective was to evaluate the effect of consuming *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) on metabolic control, intestinal microbiota and immunological response in individuals with T2D. Eight subjects with T2D received *B. lactis* HN019 or placebo for 12 weeks. Blood samples were collected to evaluate the glycemic and lipid profile, and also to determine the immunological response through the cytokines TNF- α , IL-6, IL-10 and IFN- γ . Stool samples were used to determine the relative abundance of bacterial genera from the phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. Consumption of the probiotic *B. lactis* HN019 by individuals with T2D for 12 weeks was able to reduce levels of the cytokine IFN- γ , associated with an increase in bacteria from the Verrucomicrobia and Firmicutes phylum. In addition, a reduction of approximately 11% in carbohydrate content was observed in relation to the total daily caloric value. More research is needed in order to increase the sample size to provide stronger evidence regarding the consumption of probiotics in diabetic conditions.

Keywords: type 2 diabetes, probiotics, intestinal microbiota

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho da pesquisa | 22 |
| Figura 2. Fluxograma Consort | 31 |
| Figura 3B. Distribuição de macronutrientes do grupo placebo | 37 |
| Figura 4B. Distribuição de macronutrientes do grupo probiótico | 37 |
| Figura 5B. Concentração de TNF- α em cultura de células | 38 |
| Figura 6B. Concentração de IL-6 em cultura de células | 39 |
| Figura 7B. Concentração de IL-10 em cultura de células | 40 |
| Figura 8B. Concentração de IFN- γ em cultura de células | 41 |
| Figura 9B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Firmicutes..... | 42 |
| Figura 10B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Bacteroidetes | 42 |
| Figura 11B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Actinobacteria | 43 |
| Figura 12B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Proteobacteria | 43 |
| Figura 13B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Verrucomicrobia | 44 |
| Figura 14B. Heatmap de abundância dos filios bacterianos | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Primers de filoss bacterianos | 28 |
| Tabela 2A. Características demográficas e antropométricas | 33 |
| Tabela 2B. Características demográficas e antropométricas | 35 |
| Tabela 3B. Características do perfil glicêmico e lipídico | 35 |
| Tabela 4B. Análise do consumo alimentar | 36 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. Objetivo geral | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos | 19 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Seleção de participantes | 20 |
| 3.1.1. Critérios de inclusão | 20 |
| 3.1.2. Critérios de exclusão | 21 |
| 3.2. Desenho experimental | 21 |
| 3.3. Dose | 22 |
| 3.4. Avaliação antropométrica | 23 |
| 3.5. Avaliação nutricional | 23 |
| 3.6. Avaliação do consumo alimentar | 23 |
| 3.7. Coleta de sangue | 24 |
| 3.7.1. Coleta de sangue para cultura de células mononucleares aderentes de sangue periférico | 24 |
| 3.7.1.1 Cultura de Macrófagos | 25 |
| 3.7.1.2 Cultura de Linfócitos | 26 |
| 3.8 Avaliação da resposta imunológica | 26 |
| 3.9 Avaliação da microbiota intestinal | 28 |
| 3.10 Análise dos resultados | 29 |
| 4. RESULTADOS | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 46 |
| 6. CONCLUSÃO | 53 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |
| 8. ANEXOS | 62 |
| 8.1. Anexo I – Aprovação Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto | 62 |
| 9. APÊNDICES | 65 |
| 9.1. Apêndice I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 65 |
| 9.2. Apêndice II – Triagem | 68 |
| 9.3. Apêndice III – Anamnese | 69 |
| 9.4. Apêndice IV – Recordatório Alimentar de 24 horas | 71 |

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico causado pela deficiência hereditária ou adquirida na produção de insulina pelo pâncreas ou por defeitos na sinalização pós receptores de insulina, cuja deficiência é caracterizada por hiperglicemia devido à resistência ou deficiência insulínica (SADAGOPAN *et al.*, 2023). Níveis elevados de glicose no sangue estão relacionados com o desenvolvimento de complicações microvasculares (doença renal do diabetes, retinopatia e neuropatia) e macrovasculares (doença arterial periférica, doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral), com envolvimento de múltiplos órgãos (WHO, 2016).

De acordo com o *International Diabetes Federation* (IDF), 537 milhões de pessoas vivem com diabetes no mundo. No Brasil, a prevalência da população adulta (20 a 79 anos) que tem diabetes é de 10,5%, com quase metade vivendo sem saber que tem a doença. O Brasil ocupa o sexto lugar no ranking mundial de número de pessoas com a doença. As projeções do IDF mostram que até o ano de 2045 aproximadamente 783 milhões de pessoas (12,2% da população) viverão com diabetes, refletindo num aumento estimado de 46% (IDF, 2021).

Os principais tipos de diabetes são do tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos de diabetes. No entanto, mais de 90% das pessoas com diabetes tem diabetes tipo 2, caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue, resultado de uma combinação de secreção insuficiente de insulina e resistência à insulina (ASEMI *et al.*, 2013). Além disso, os principais fatores de risco que desencadeiam o desenvolvimento da doença são fatores genéticos, diminuição dos níveis de atividade física e aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade (IDF, 2021). Nesse contexto, o diabetes é considerado uma preocupação global de grande impacto na saúde pública.

Dentre as principais estratégias para o manejo do diabetes tipo 2 (DM2) estão as modificações no estilo de vida, que incluem a prática de atividade física e mudanças na alimentação.

Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando uma relação importante entre o desenvolvimento do DM2 e a microbiota humana, principalmente intestinal.

A microbiota é descrita como um ecossistema complexo e abundante, composto por trilhões de microrganismos (CHÁVEZ-CARBAJAL *et al.*, 2020). Os microrganismos são seres microscópicos, que individualmente são invisíveis a olho nu. São seres de estrutura organizada, capazes de crescer e se reproduzir. Os principais microrganismos são os vírus, bactérias, arqueas, fungos, algas e protozoários (VERMELHO *et al.*, 2006) e estão distribuídos em diferentes órgãos e tecidos do organismo humano. A sua distribuição depende de fatores como a umidade, acidez, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Embora esta se distribua por várias áreas do corpo, a maior parte da colonização (cerca de 70%) ocorre no intestino (GONÇALVES, 2014).

A microbiota intestinal é composta por uma gama de microrganismos que vivem de forma simbiótica no trato gastrointestinal humano. Nesse sentido, a microbiota tem funções como metabolização e absorção de nutrientes, manutenção da integridade da mucosa intestinal, proteção contra patógenos e modulação do sistema imunológico.

No entanto, as mudanças são evidentes ao longo da vida humana, pois cada ser humano desenvolve um microbioma diferente, determinado por características genéticas, fatores ambientais, mudanças temporais, padrões alimentares, entre outros fatores (CHO, BLASER, 2012). O microbioma diz respeito aos genes que constituem o genoma do grupo de microrganismos que habitam aquele local (MARCHESI, 2017).

Os principais filos que colonizam o trato gastrointestinal humano são cinco: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia.

Contudo, os filos Firmicutes e Bacteroidetes são os mais predominantes, pois constituem 90% das bactérias existentes na microbiota intestinal (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

Alguns autores propõem que a microbiota de animais e humanos obesos apresentam uma proporção entre os filos bacterianos Firmicutes e Bacteroidetes, sendo essa proporção chamada de “proporção F/B”, significativamente elevada em comparação com a microbiota de indivíduos não-obesos, sugerindo a utilização dessa razão como um possível biomarcador da obesidade (VAZ, 2021).

O filo Firmicutes, cuja classe é composta por mais de 200 gêneros de bactérias, que incluem os gêneros mais predominantes de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Clostridium* (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

O filo Bacteroidetes destaca-se por prevalência de dois gêneros bacterianos predominantes: *Bacteroides* e *Prevotella*, associados à manutenção da saúde intestinal e prevenção de doenças, modulando o sistema imune de forma benéfica (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

O filo Actinobacteria representa de 2 a 14% das bactérias intestinais. Representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium*, com funções benéficas para a saúde como a estimulação do sistema imunológico, a inibição de bactérias potencialmente patogênicas e manutenção da barreira intestinal (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

O filo Proteobacteria representa cerca de 5% das bactérias do intestino. Dentro desse filo encontram-se as bactérias da família Enterobacteriaceae, como a espécie *Escherichia coli*, que apresenta associação às doenças inflamatórias intestinais (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

O filo Verrucomicrobia é representado principalmente pelo gênero *Akkermansia* (CHECA-ROS *et al.*, 2021).

Akkermansia muciniphila (*A. muciniphila*) é uma bactéria anaeróbica Gram-negativa pertencente ao filo *Verrucomicrobia* (RODRIGUES *et al.*, 2022). Sabe-se que *A. muciniphila* coloniza, no início da vida, a camada mucosa do trato gastrointestinal (especialmente no ceco, onde a maior parte da mucina é produzida), onde desencadeia respostas metabólicas e imunológicas do hospedeiro. As mucinas são capazes de aumentar efetivamente a espessura do muco e melhorar a barreira intestinal. Recentemente, *A. muciniphila* tem recebido atenção considerável, uma vez que seu nível aumentado no trato gastrointestinal está associado a resultados favoráveis para a saúde humana, incluindo proteção contra obesidade, diabetes e doenças metabólicas (ZHAO *et al.* 2023).

Em particular, a disbiose de determinados filios de bactérias tem sido associada ao aumento da permeabilidade intestinal, com infiltração de subprodutos bacterianos através de uma barreira intestinal permeável, desencadeando respostas inflamatórias subsequentes características do diabetes (IATCU; STEEN; COVASA, 2021). Essa disbiose causa um crescimento excessivo de espécies microbianas

inflamatórias, particularmente de bactérias gram-negativas, que promovem um aumento de LPS. O LPS se liga aos receptores *toll like* (TLR-4), levando à fosforilação do substrato receptor de insulina (IRS-1) e à diminuição da captação do transportador de glicose (GLUT-4), aumentando assim a glicemia sérica e piorando a resistência periférica à insulina. A ligação LPS/TLR-4 contribui para a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e também causa a endotoxemia metabólica. Ao passo que essa endotoxemia metabólica contribuirá para a cascata hipotalâmica de JNK e ativação de c-JUN, que interage com o IRS-1, promovendo resistência central à insulina, agravando o quadro (HAMAMAH; IATCU; COVASA, 2024).

Desta maneira, a microbiota intestinal pode ser considerada um alvo de tratamento, pois tem impacto importante na regulação de vias metabólicas importantes na patogênese do diabetes (EJTAHED *et al.*, 2016, MUSCOGIURI *et al.*, 2016).

Conseqüentemente, o consumo de probióticos em condições de diabetes vêm ganhando notável importância, pois pode representar uma terapia complementar e adjuvante nesta complexa doença (AUNE *et al.*, 2013, PASIN; COMERFORD, 2015). Evidências de estudos experimentais e ensaios clínicos apontam que algumas cepas probióticas são capazes de modular a microbiota e assim regular a homeostase da glicose e conseqüentemente o prognóstico do diabetes (PANWAR *et al.*, 2013, BOURRIE *et al.*, 2016, LI *et al.*, 2016).

Segundo a definição da Organização Mundial da Saúde, probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Há então, mundialmente, uma crescente demanda por alimentos que contêm probióticos devido às contínuas evidências de pesquisas indicando seus potenciais benefícios para os consumidores, tais como melhora na sensibilidade à insulina e diminuição dos níveis de endotoxinas (SABICO *et al.*, 2019), redução de tecido adiposo visceral e grau de esteatose hepática (LAUE *et al.*, 2023), entre outros.

O uso de probióticos no Brasil é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e requer prévia avaliação dos probióticos a fim de se comprovar a identidade da linhagem do microrganismo, sua segurança quanto ao consumo e a comprovação do seu efeito benéfico (ANVISA, 2019).

Sendo assim, a ANVISA atualiza a lista de microrganismos baseado nas evidências dos produtos probióticos e seus benefícios. No ano de 2017, foram relacionadas oito linhagens que atenderam aos critérios e foram avaliadas com propósito de inclusão na lista de probióticos autorizados para o uso, sendo uma delas a linhagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, com alegação de contribuição para a saúde gastrointestinal, na condição de uso na dose de 10⁹ UFC/dia, seguro para crianças maiores de 3 anos, adolescentes e adultos (ANVISA, 2017).

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019 (*B. lactis* HN019) é uma cepa originalmente isolada de iogurte comercial e comercializada como ingrediente para alimentos e suplementos dietéticos. Em um estudo de análise transcricional e funcional, a sequência completa do genoma do probiótico *B. lactis* HN019 foi publicada por Morovic e colaboradores (2018), permitindo assim um controle rigoroso da qualidade, segurança e pureza do produto, garantindo a confirmação da sua identidade.

Há estudos que relatam muitos efeitos relacionados ao seu consumo, como modulação da microbiota intestinal (LAI *et al.*, 2023), manutenção das funções da barreira intestinal em casos de infecções gastrointestinais, modulação da resposta imunológica em mucosa oral (INVERNICI *et al.*, 2020) e mais evidentemente regulação da motilidade intestinal com melhora dos sintomas de constipação (AIRAKSINEN *et al.*, 2019).

Um trabalho conduzido por Ejtahed *et al.* (2011) demonstrou que o tratamento com probióticos (iogurte enriquecido com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*) em pessoas diabéticas durante 6 semanas foi capaz de reduzir significativamente a glicemia de jejum e hemoglobina glicada (HbA1c).

Os resultados apresentados por Ostadrahimi (2015) corroboram com os dados anteriores. O efeito do leite fermentado do kefir foi avaliado sobre o controle glicêmico e perfil lipídico de 60 pacientes diabéticos, divididos em dois grupos: um grupo recebeu leite fermentado de kefir e o outro grupo recebeu leite fermentado convencional durante 8 semanas. A comparação da glicemia de jejum entre os dois grupos após a intervenção foi significativa diminuída, bem como os valores de HbA1c que foram reduzidos no grupo tratado com kefir. Não foram encontradas nenhuma diferença nos níveis de triglicérides, colesterol total, colesterol LDL e

colesterol HDL. Já, o estudo de Fioruzi (2016) observou que a suplementação com probióticos melhorou significativamente a HbA1c, mas não teve efeito sobre a glicemia de jejum. Porém, o autor discute o fato de que a glicemia de jejum contribui com aproximadamente 30% para a HbA1c, enquanto que a glicemia pós-prandial contribui com quase 70%, podendo supor que as melhorias em glicemia pós-prandial levaram à diminuição no grupo de probiótico (FIORUZI *et al.*, 2016).

No estudo de Soleimani e colaboradores (2017) a suplementação de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum*) por 12 semanas entre pacientes diabéticos em hemodiálise teve efeitos benéficos nos parâmetros da homeostase da glicose e em alguns biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo, com destaque para redução de Proteína C Reativa, glicemia de jejum e índice de HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment*), cujo índice avalia resistência à insulina.

A pesquisa de Kobyliak e equipe (2018) ofertou sachê de multiprobiótico contendo biomassa concentrada de 14 gêneros de bactérias probióticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*) ou placebo por 8 semanas para 53 pacientes com diabetes. Obteve resultados positivos como redução de índice HOMA-IR, mas sem redução significativa de hemoglobina glicada. Além disso, dos marcadores do estado inflamatório sistêmico crônico, apenas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL-1 β) se alteram significativamente após o tratamento com probiótico.

Em trabalho realizado por Khalili e colaboradores (2019) com 40 pacientes com diabetes tipo 2 que receberam uma cápsula diária contendo 10⁸ UFC de *L. casei* durante 8 semanas, foi possível observar redução significativa na glicemia de jejum, redução na concentração de insulina e na resistência à insulina (medida por meio do HOMA-IR) no grupo probiótico em comparação com o grupo placebo.

É possível notar que os efeitos benéficos mais relevantes da suplementação de probióticos em diabéticos estão relacionados à glicemia de jejum, hemoglobina glicada, além de melhora da resistência à insulina. Além disso, as cepas mais comumente utilizadas são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com resultados significativos nesses parâmetros.

O desenvolvimento de DM2 relacionado à obesidade tem como principal colaboradora a inflamação do tecido adiposo, o qual sofre modificações metabólicas,

como aumento de lipólise e elevação de migração e/ou diferenciação de células imunitárias inflamatórias residentes no tecido adiposo, entre as quais destacam-se macrófagos, linfócitos e neutrófilos, que corroboram para síntese de citocinas (GOMES, ACCARDO, 2019).

As citocinas podem ser produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, e cada tipo de citocina estimula diferentes tipos celulares, envolvidos no sistema imunológico e processos inflamatórios. Na fase de ativação da resposta imunológica, as citocinas estimulam a diferenciação e crescimento de linfócitos, já na fase efetora, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, ativam diferentes tipos de células com o intuito de eliminar microrganismos invasores e antígenos.

As citocinas também podem ser chamadas de monocinas ou linfocinas dependendo do tipo de célula que as produziram, assim as primeiras seriam produzidas por monócitos e as segundas por linfócitos (ABBAS; LICHTMAM, 2003).

Monócitos são responsáveis por fagocitose e estão indiferenciados na corrente sanguínea e são chamados de macrófagos quando estão maduros e instalados em um tecido (ABBAS; LICHTMAM, 2003).

Linfócitos são células importantes na resposta imunológica tanto humoral quanto celular e sua funcionalidade está relacionada com a capacidade de defesa do organismo contra infecções, mas também com o desenvolvimento de doenças auto-imunes. São estimuladas por antígenos ou por mitógenos como a Concanavalina A (Con-A) (ABBAS; LICHTMAM, 2003).

Entre as citocinas mediadoras e reguladoras do sistema imune inato o principal representante é o TNF- α (PETTO *et al.*, 2015). Além dele, a interleucina-6 (IL-6) também é secretada em excesso na condição de hiperplasia dos adipócitos e infiltração de macrófagos e linfócitos no tecido adiposo – associação do sistema imunológico, atuando na redução da cadeia de sinalização insulínica e consequente translocação de glicose, bem como alteração da homeostase energética e massa corporal, contribuindo para desencadeamento do DM por resistência à ação da insulina (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). A produção de TNF- α é feita principalmente por macrófagos e é estimulada por endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede estrutural externa das bactérias gram-negativas, que tem a função de manter a integridade da parede celular.

A interleucina-10 (IL-10) também faz parte do sistema imune inato, com atividade anti-inflamatória com níveis circulantes mais baixos em pacientes com DM2. A IL-10 regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, que prejudicam o funcionamento adequado da insulina (NAZ *et al.*, 2020).

Por sua vez, o sistema imune adaptativo é representado pela citocina interferon gamma (IFN- γ), produzida pelas células de linfócitos T *helper* (Th1), que quando estimuladas por antígenos produzem citocinas, com importante papel na defesa contra vírus e patógenos intracelulares, atuando na indução de respostas inflamatórias imunomediadas. Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o IFN- γ participa na patogênese do diabetes mellitus principalmente regulando positivamente a expressão de antígenos específicos e moléculas de adesão em vários tipos de células, incluindo células β pancreáticas. O IFN- γ tem sido detectado em quantidades crescentes durante a progressão para diabetes (TSIAVOU *et al.*, 2005, HAMMAD *et al.*, 2021).

Vários estudos sobre a participação de processos inflamatórios crônicos no desenvolvimento da resistência insulínica têm demonstrado níveis elevados de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 em soro de pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Akram Kooshki, Tofighiyan, Rakhshani (2015) avaliaram 44 pacientes com diabetes tipo 2 que receberam placebo ou um comprimido simbiótico (prebiótico e probiótico) durante 8 semanas. As concentrações séricas de PCR, IL-6 e TNF- α diminuiriam significativamente no grupo simbiótico ao final do estudo em comparação ao grupo placebo.

Já o trabalho de Mazloom, Yousefinejad, Dabbaghmanesh (2013) e sua equipe (2013) não conseguiu observar nenhuma alteração significativa nas concentrações de IL-6, quando avaliou 34 pacientes diabéticos tipo 2 e ofereceu probióticos (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. bifidum* e *L. casei*) ou placebo para cada grupo. A dose foi de 1.500 mg duas vezes ao dia, após o almoço e o jantar, durante 6 semanas.

Em um estudo experimental (ZENG *et al.*, 2021), com ratos diabéticos, foi possível observar que o tratamento com *Lactobacillus paracasei* NL41 induziu melhora no estado infamatório, reduzindo os níveis de LPS, TNF- α , IL-6 e aumentando os níveis de IL-10. Além disso, o probiótico induziu alterações na

composição da microbiota e influenciou a abundância relativa das espécies-chave, especificamente, Bacteroides, Clostridia e Parasutterella foram significativamente reduzidos, enquanto alguns microrganismos benéficos tiveram sua abundância relativa aumentada (Bacteroidales_S24-7_group e as famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae).

Considerando os resultados apresentados, é possível notar a participação das citocinas no desenvolvimento de complicações frequentes em DM2, como maior susceptibilidade a infecções e processos degenerativos que levam às alterações macro e microvasculares. Dessa forma, é importante buscar compreender os mecanismos envolvidos nesse processo. Mesmo com as evidências científicas sobre o consumo de probióticos para indivíduos com DM2, ainda não são totalmente elucidados os mecanismos pelos quais eles podem atuar.

Sendo assim, justifica-se a realização da pesquisa a fim de avaliar qual o impacto que o consumo de *B. lactis* HN019 terá na modulação do controle glicêmico, bem como na resposta imunológica, por meio de citocinas imunomoduladoras e também na microbiota intestinal de indivíduos com diabetes tipo 2.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, na microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos com diabetes tipo 2.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Investigar os efeitos da suplementação de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico do diabetes, considerando como desfecho primário a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada;

b) Avaliar medidas antropométricas como peso, estatura e índice de massa corporal (IMC) e perímetro abdominal;

c) Analisar consumo alimentar antes e depois da suplementação;

d) Avaliar a resposta imunológica, através da determinação dos níveis de citocinas encontradas em células mononucleares aderentes de sangue periférico antes e após a suplementação;

e) Analisar a microbiota intestinal dos participantes no período pré e pós suplementação com o probiótico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FMRP – USP) com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 70245417.5.0000.5440.

3.1 Seleção dos participantes

Os participantes da pesquisa foram recrutados inicialmente através do Ambulatório de Diabetes e Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC) – FMRP/USP, que atende a população da cidade e região.

Depois, o convite para pesquisa se estendeu aos colaboradores do HC, por meio de e-mail institucional e cartazes distribuídos pelo hospital. E por fim, foi aberta a divulgação à população em geral por meio do site do hospital e suas mídias sociais como Facebook e Instagram.

Para participação na fase de triagem todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Pacientes que atendiam aos critérios de inclusão passaram por uma triagem que incluía a dosagem de glicemia e hemoglobina glicada. Os voluntários que apresentaram glicemia de jejum maior que 126 mg/dL e hemoglobina glicada acima de 7% foram selecionados para participação na pesquisa.

3.1.1 Critérios de inclusão

A amostra foi selecionada de acordo com os seguintes critérios de inclusão: adultos, tanto do sexo feminino como masculino, com idade entre trinta e sessenta anos, com diagnóstico de diabetes tipo 2 e que estivessem com índice de massa corporal (IMC) dentro dos parâmetros de sobrepeso ou obesidade grau I, ou seja, entre 25 e 35 Kg/m², respectivamente. Os critérios para diagnóstico do diabetes mellitus foram baseados nas recomendações da Organização Mundial de Saúde, que considera diabetes uma glicemia de jejum maior que 126 mg/dL e a hemoglobina glicada acima de 7%.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo gestantes e/ou lactantes, indivíduos que relataram hepatopatias agudas ou crônicas, em uso de anticoagulante sistêmico ou imunossupressores, bem como aqueles que apresentavam complicações crônicas do diabetes em estágios avançados (doença renal do diabetes, retinopatia e neuropatia). Além disso não podia ter feito uso de antibióticos nos últimos 3 meses.

3.2 Desenho experimental

Após explicação do estudo, todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I) no qual concordavam com a participação voluntária na pesquisa.

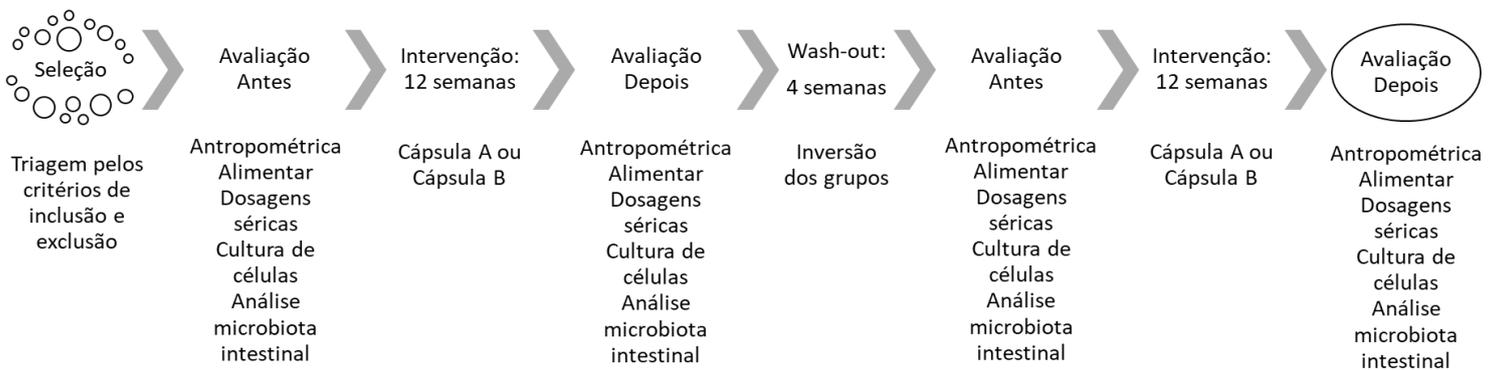
Após a assinatura do termo, o participante passava para a fase de triagem (Apêndice II) que incluía o exame de sangue para inclusão na pesquisa. Após seleção do participante, o mesmo respondia um questionário de anamnese (contendo perguntas de identificação pessoal, histórico pessoal e familiar de doenças (Apêndice III).

Os participantes foram então alocados, aleatoriamente por sorteio, em dois grupos (A ou B). Dependendo do grupo ao qual pertencia, cada participante recebia cápsulas identificadas com a letra A ou letra B, que eram iguais em aspecto, textura, odor e sabor. Uma das cápsulas continha o probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 e a outra continha apenas o excipiente, que era à base de amido de milho. O período de suplementação era de 12 semanas. Aqueles que consumiram cápsula A por um período de 12 semanas, após um período de *wash-out* de 4 semanas, passaram a receber a cápsula B, a qual consumiram por igual período de 12 semanas; aqueles que receberam inicialmente a cápsula B pelo período de 12 semanas, após um período de *wash-out* de 4 semanas, passaram a receber a cápsula A, por igual período de 12 semanas. Todos os participantes foram orientados a manterem seus hábitos alimentares e a prática de atividade física (se presente) durante a pesquisa. A orientação era de diluir o conteúdo da cápsula em 15 mL de água, agitar por 10 segundos e então ingerir a solução. O consumo seria uma vez ao dia.

Este modelo de estudo é classificado como estudo clínico randomizado cruzado, controlado por placebo, duplo-cego, cujo pesquisador e participante não sabem qual cápsula está sendo consumida.

Todas as análises foram feitas nos dois momentos: antes e após a suplementação, como demonstra a Figura 1, com o desenho da pesquisa.

Figura 1. Desenho da pesquisa



No primeiro encontro, os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica e antropométrica, incluindo medição de peso, estatura e perímetro abdominal. Foi realizada uma avaliação do consumo alimentar por meio do recordatório alimentar de 24 horas (Apêndice IV). Houve a coleta de amostra de sangue, realizada por profissionais enfermeiros, para dosagem de hemograma e lipidograma completos e cultura de células mononucleares de sangue periférico para posterior dosagem de citocinas séricas em sobrenadante. Também foi solicitada uma amostra de fezes do voluntário para análise da microbiota intestinal. Neste momento também foi feita a entrega das cápsulas, assim como as orientações para seu consumo. Após o período de tratamento os pacientes eram reavaliados pelo mesmo protocolo.

3.3 Dose

A dose oferecida na cápsula foi de 6 bilhões de unidades formadoras de colônias (UFC)/dia (ou seja, 6×10^9 UFC/dia). Em adultos, os estudos que avaliam efeitos terapêuticos apresentam doses variáveis de 10^6 a 10^9 UFC/dia, sendo indicado seu uso por pelo menos 5 dias (MORAIS; JACOB, 2006).

3.4 Avaliação antropométrica

Os parâmetros antropométricos descritos a seguir, foram avaliados no início e ao final do período de suplementação.

Peso: a massa corporal total do indivíduo foi avaliada em quilos (kg), utilizando uma balança eletrônica portátil da marca TANITA®, modelo 554, com capacidade de 150 kg e com precisão de 100g.

Estatura: a estatura foi aferida em centímetros (cm), utilizando um estadiômetro portátil da marca SANNY®, modelo Personal Caprice, com extensão até 2 metros e graduação em milímetros.

Perímetro abdominal: para aferição desta medida, a fita métrica (WCS®) foi passada ao redor da cintura, na menor curvatura localizada entre a última costela e a crista íliaca do voluntário. A unidade de medida utilizada foi centímetros. Para minimizar a chance de erros, esta medida foi aferida pelo mesmo avaliador nos dois momentos.

3.5 Avaliação nutricional

O estado nutricional foi avaliado por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), sendo realizado no início e no final do período de suplementação.

Este índice foi obtido através da razão entre o peso e a altura elevada ao quadrado. Conforme a classificação da Organização Mundial da Saúde, os indivíduos que apresentaram IMC entre 25 Kg/m² e 29,9 Kg/m² foram classificados com sobrepeso e os que apresentaram IMC entre 30 Kg/m² e 34,9 Kg/m² foram classificados como obesos de grau I.

3.6 Avaliação do consumo alimentar

O método utilizado para a coleta de dados dietéticos foi o recordatório alimentar de 24 horas.

O recordatório alimentar de 24 horas (R24h) é utilizado como instrumento de avaliação do consumo alimentar. Consiste na obtenção de informações verbais sobre a ingestão alimentar das últimas 24 horas anteriores, com dados sobre os alimentos e bebidas consumidos, inclusive o preparo, e informações sobre quantidade e tamanho das porções, em mililitros e medidas caseiras (BUENO;

CZEPIELEWSKI, 2010). Este método foi realizado antes do início da suplementação e ao final da mesma. O cálculo da ingestão alimentar foi realizado no programa Dietbox.

3.7 Coleta de sangue

O sangue coletado a cada visita foi utilizado para avaliação de glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol e triglicérides. Também foi feita coleta de sangue para cultura de células mononucleares aderentes de sangue periférico.

A coleta de amostra de sangue foi feita no período na manhã, realizada com o participante em jejum, para todos os exames. Inicialmente foi realizada a assepsia do local com algodão umedecido com solução de álcool 70%, para então, realizar-se punção venosa com sistema *BD Vacutainer* (Beliver Industrial Estate, Plymouth – UK) e coleta de 18 a 20 mL de sangue em tubos heparinizados, em condições de esterilidade.

3.7.1 Coleta de sangue para cultura de células mononucleares aderentes de sangue periférico

A amostras de sangue foi encaminhada para o laboratório de Cultura de Células do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP para o processamento e isolamento de células mononucleares aderentes do sangue periférico de cada indivíduo envolvido na pesquisa. As culturas foram desenvolvidas de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório, como descrito a seguir:

Após a coleta de aproximadamente 18 mL de sangue em 2 tubos heparinizados de 10 mL, diluiu-se o sangue total com igual volume de solução salina estéril a 37°C e homogeneizou-se suavemente com pipeta de Pasteur. Em seguida, foi utilizado o gradiente de Ficoll-Hypaque^R para a separação das células mononucleares, procedimento no qual o sangue diluído foi aplicado delicadamente às paredes dos tubos de polipropileno contendo Ficoll-Hypaque^R. Após centrifugação a 1600 rpm durante 30 minutos, à temperatura de 24°C, verificou-se a formação das camadas distintas, sendo que a superior era formada por plasma e plaquetas; a interface, por células mononucleares; a média, por gradiente Ficoll-Hypaque e a inferior, por granulócitos e hemácias. As células da camada de

monócitos foram cuidadosamente aspiradas e colocadas em tubo Falcon estéril. As células foram re-suspensas com solução salina, levadas para centrifugar novamente e lavadas por mais duas vezes.

Após homogeneização do material, a amostra foi re-suspendida com 2 mL de *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), que é um meio de cultura que permite a manutenção do pH fisiológico em ambiente reduzido em CO₂. Em seguida procedeu-se à contagem desta suspensão em câmara de Neubauer em microscópio óptico, diluindo 5 µL da suspensão em 100 µL de corante Turk (capaz de lisar hemácias e deixar glóbulos brancos corados para facilitar a contagem).

As células encontradas nos quatro quadrantes foram somadas e multiplicadas por 50 (mm³), acrescentando-se três zeros para se estimar o número de células por mL. A suspensão de células foi diluída com o mesmo meio de cultura, cuja concentração de glicose era de 2 g/L, enriquecido com o soro AB humano 15%, inativado pelo calor, para obter as concentrações de células de 3,0 x 10⁶ células/mL, necessárias para a cultura de macrófagos e linfócitos.

3.7.1.1 Cultura de Macrófagos

As placas de cultura de 24 poços foram preparadas em duplicatas. As células foram re-suspensas em meio de cultura contendo 2,5% de Soro Bovino Fetal. Depois, foi colocado 1,0 mL da suspensão de células mononucleares de sangue periférico, com concentração final de 1,5 x 10⁶ células/mL em cada poço e incubado durante 2 horas a 37°C com 5% de CO₂ para a aderência de mononucleares. Após o período de 2 horas de incubação, o sobrenadante (células não aderentes) foi desprezado, as placas foram lavadas por mais duas vezes com meio de cultura a fim de que fossem removidas todas as células não aderidas. Depois um dos poços da amostra recebeu o estímulo com 5µL de *Lipopolysaccharides* (LPS) 10 mg/mL (DE WALL MALEFYT *et al.*, 1991) e o outro foi mantido como basal.

As células foram fechadas e incubadas novamente a 37°C em ambiente úmido e com 5% de CO₂ por 48 horas, quando então, o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos "Eppendorf" a 80°C negativos para posterior quantificação de citocinas (TNF-α e IL-6).

3.7.1.2 Cultura de Linfócitos

Foram preparadas culturas em duplicatas com o volume restante utilizado para cultura de macrófagos a fim de se obter uma concentração final de $2,5 \times 10^6$ linfócitos/mL, adicionando em suspensão o meio de cultura contendo 15% de Soro Bovino Fetal. Após a diluição, a suspensão foi transferida para cada poço da placa na concentração final de $2,5 \times 10^6$ células em culturas controles e em $2,5 \times 10^6$ células estimuladas com Concanavalina A (Con-A) 10 mg/mL.

As placas foram fechadas e incubadas a 37°C em ambiente úmido e com 5% de CO₂ por 72 horas.

Completado o período de incubação, os sobrenadantes de cultura foram coletados e mantidos a 80°C negativos em tubos "Eppendorf" para posterior dosagem de citocinas (IFN- γ e IL-10).

3.8. Avaliação da resposta imunológica

As concentrações das citocinas TNF- α e IL-6, IL-10 e IFN- γ em humanos foram quantificadas pelo sistema de ensaio imunoenzimático (ELISA).

O ensaio contém IL-10 e IL-6 e IFN- γ recombinante humana que foi produzido usando cDNA, específico para cada tipo de citocina, clonada em bacilovírus e expressada em células de inseto T.ni e TNF- α produzida em *E.coli*. O imunoensaio empregou a técnica quantitativa em formato de sanduíche; utilizando anticorpo de captura purificado e o anticorpo biotinizado específico para cada citocina como o anticorpo de detecção.

Para desenvolvimento da técnica de ELISA foi utilizada placa de microtitulação de poliestireno com 96 poços e o passo a passo está descrito a seguir:

Inicialmente foi diluído o anticorpo de captura na concentração de 1 μ g/mL e adicionado 50 μ L desse anticorpo diluído para cada poço de placa. As placas foram, então, fechadas com tampa "veda placa" para evitar evaporação e incubado overnight a 4°C. Após este período de incubação, lavou-se a placa preenchendo o poço com tampão de lavagem usando uma pipeta multicanal, repetindo o processo mais três vezes, totalizando quatro lavagens, desprezando-se o sobrenadante. Após

a solução ser removida, foi adicionado 200 μ L de tampão de bloqueio (10% soro bovino fetal FBS), previamente filtrado para remover partículas presentes, em PBS para um bloqueio por ligação não específica. As placas foram fechadas e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora, quando então foram lavadas novamente por três vezes com PBS/Tween. As amostras foram separadas e as curvas-padrão foram preparadas segundo padronização prévia para cada citocina.

O preparo da curva padrão partiu da solução de TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e com diluição seriada produzindo diferentes diluições para cada citocina. As concentrações nas curvas padrões de TNF- α e IL-10 partiram de 500 pg/mL até 7,813 pg/mL, enquanto que a curva padrão de IL-6 e IFN- γ foi padronizada com concentrações iniciadas em 600 pg/mL até 9,375 pg/mL. A concentração ideal do anticorpo de captura foi baseada na densidade óptica das curvas realizadas.

Após o preparo das diluições seriadas, foram adicionados imediatamente às placas o volume de 50 μ L por poço, em duplicata. Nos poços restantes, foram adicionados 50 μ L do sobrenadante de cada amostra. Nesta fase, as moléculas da citocina presentes em cada solução eram ligadas ao anticorpo imobilizado no fundo da placa. As placas foram novamente fechadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, e após este período foram lavadas seis vezes com PBS/Tween.

O anticorpo de detecção biotilado foi diluído para a concentração de 1 μ L/mL com tampão de bloqueio/Tween e adicionado enzima peroxidase conjugada a estreptavidina. E então o conjugado (anticorpo de detecção + enzima reagente estreptavidina) foi adicionado a cada poço num volume de 50 μ L. As placas foram fechadas e incubadas em temperatura ambiente por mais 1 hora e após este período foram lavadas por mais seis vezes com PBS/Tween.

Após esse processo, o substrato de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) foi adicionado a cada pocinho no volume de 50 μ L. A placa foi incubada em temperatura ambiente no escuro por aproximadamente 30 minutos para a formação de cor. O TMB desenvolve uma reação solúvel na cor azul. Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 25 μ L de uma solução ácida "*Stopping Solution*" (ácido sulfúrico 16%), que conferiu um produto de coloração amarela. Por fim, foi realizada

a leitura da densidade óptica de cada poço em sistema computadorizado ajustado para absorvância de 450nm.

O mesmo método é empregado para determinação de todas as citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ . O que difere em cada análise é o anticorpo de detecção, específico para cada citocina.

3.9 Avaliação da microbiota intestinal

Foram coletados, em recipientes estéreis, aproximadamente 5 gramas de fezes de todos os participantes no início e ao final das 12 semanas, e posteriormente foram armazenadas à 80°C negativos até sua utilização. O DNA total foi extraído das amostras fecais, utilizando kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. A análise qualitativa e quantitativa do DNA metagenômico de diferentes filos bacterianos foi realizada por eletroforese em gel de agarose e posterior reação de amplificação por PCR em tempo real, otimizado por conjuntos de primers 16S rRNA eubacterianos ou táxon-específicos (Tabela 1). As diferenças (Δ CT) entre os valores de CT (limiar do ciclo) de eubactérias e grupos bacterianos específicos foram utilizadas para obter níveis normalizados de cada grupo bacteriano ($2^{-\Delta$ CT). A abundância relativa de cada grupo bacteriano foi determinada após normalização para o grupo placebo.

Tabela 1. Primers de filos bacterianos

| Filos | RNA molde | RNA transverso |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Bacteroidetes | GTTTAATTTCGATGATACGCGAG | TTAASCCGACACCTCACGG |
| Bifidobacterium | CTCCTGGAAACGGGTGG | GGTGTICTTCCCGATATCTACA |
| Proteobacteria | CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG | CTCTACGAGACTCAAGCTTGC |
| Firmicutes | ATGTGGTTTAATTCGAAGCA | AGCTGACGACAACCATGCAC |
| Eubacteria | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT | ATTACCGCGGCTGCTGGC |
| Actinobacteria | TGTAGCGGTGGAATGCGC | AATTAAGCCACATGCTCCGCT |
| Verrucomicrobia | TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT | CAGTTTTYAGGATTTCCCTCCGCC |

3.10 Análise dos resultados

As características dos participantes serão apresentadas considerando o estudo clínico cruzado, considerando a participação de 4 pessoas no grupo probiótico e 3 pessoas no grupo placebo. A fim de tentarmos avaliar maiores efeitos nos desfechos primários (glicemia de jejum e hemoglobina glicada) e secundários, todos os outros resultados serão apresentados considerando o agrupamento em 2 grupos, sendo que todos receberam tanto probiótico quanto placebo, independente do período de consumo de cada indivíduo.

Os resultados serão apresentados na forma de média e desvio padrão.

O nível de significância adotado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$) e valores de p menores ou iguais a 0,05 foram anotados no texto.

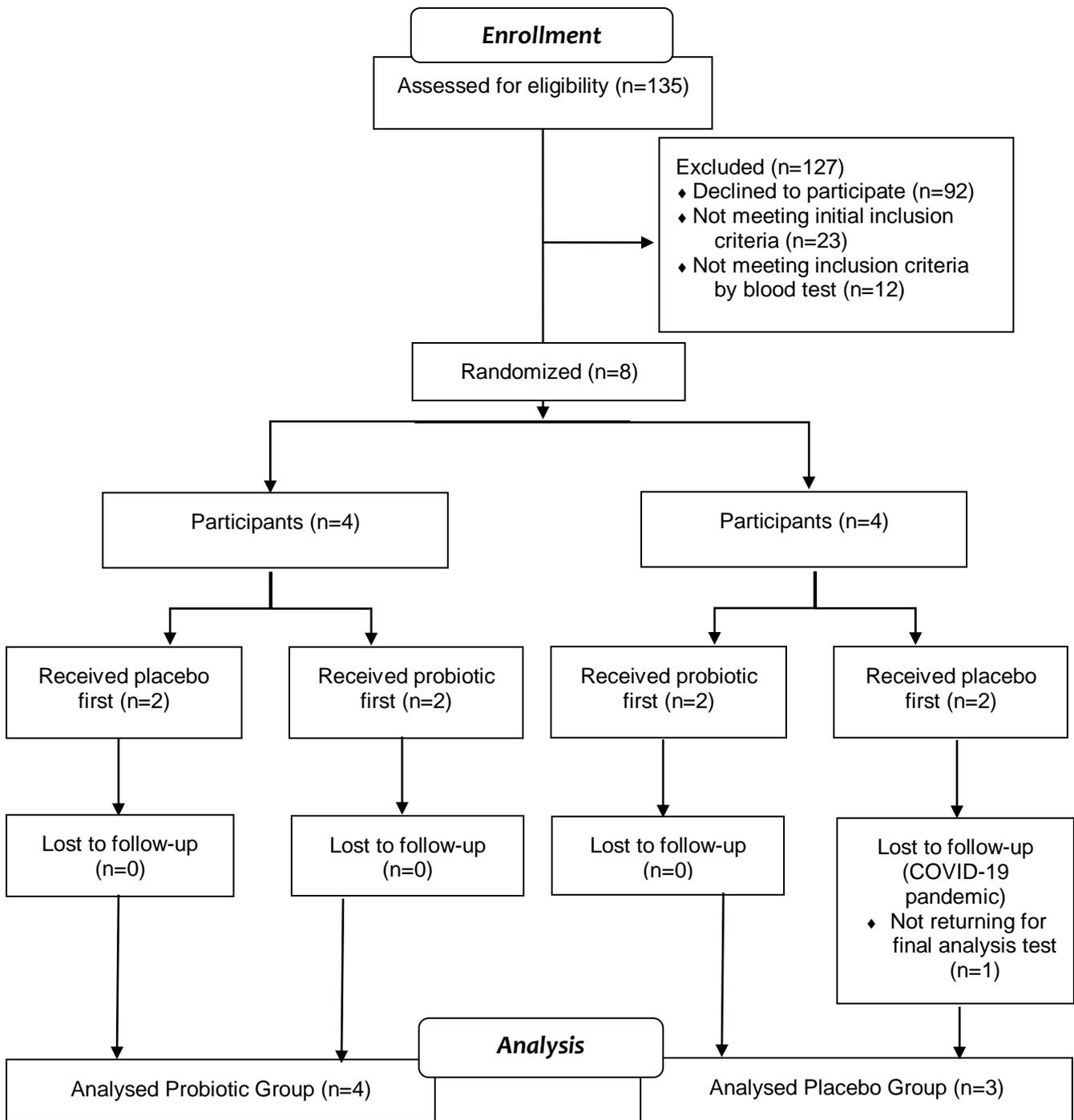
A análise estatística realizada foi o teste t para amostras não pareadas, considerando o momento antes e depois da suplementação com o probiótico ou placebo. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows 10. Para a elaboração da representação gráfica dos dados foram utilizados os programas Microsoft Excel, versão 2021 e GraphPad Prism, versão 8.0.

4. RESULTADOS

Inicialmente, 135 pessoas entraram em contato via e-mail para participação na pesquisa, porém muitos deles não responderam mais aos contatos ou não poderiam participar da pesquisa em virtude do tempo que seria despendido. Por fim, dos 135 interessados, restaram apenas 43 pessoas que continuaram demonstrando interesse em participação na pesquisa, porém nem todos foram elegíveis nos critérios iniciais de inclusão: peso, estatura e índice de massa corporal (IMC). Dos 43 interessados, somente 20 preencheram estes critérios de inclusão e passaram para a fase de triagem, que incluía um exame de sangue para dosagem de glicemia de jejum e hemoglobina glicada.

Por fim, foram selecionados 8 participantes que completaram o período de suplementação, mas um deles não retornou para última análise, em virtude do início da pandemia (Março/2020). Ou seja, a pesquisa finalizou com o total de 8 participantes para análise no grupo probiótico e 7 participantes no grupo placebo, conforme fluxograma de CONSORT (2010) mostrado na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma Consort



Alguns participantes relataram efeitos relacionados ao consumo da cápsula. No início da suplementação, dois participantes relataram desconforto gástrico com melhora posterior e outros 3 participantes relataram melhora do hábito intestinal.

O estudo é caracterizado como estudo clínico randomizado cruzado, controlado por placebo, duplo cego. Os resultados das características da amostra

serão apresentados considerando o estudo cruzado e todos os outros resultados serão apresentados considerando o agrupamento em probiótico ou placebo.

A) Dados considerando estudo cruzado dos participantes

Um grupo recebeu inicialmente placebo por 12 semanas e após o *wash-out* (4 semanas) recebeu probiótico pelo mesmo período. O outro grupo fez o inverso, ou seja, inicialmente recebeu o probiótico durante 12 semanas e após o *wash-out* (4 semanas) recebeu placebo por igual período.

As características demográficas e antropométricas (número de participantes, idade, gênero, tempo de doença, massa corporal, IMC e perímetro abdominal) em todos os períodos de suplementação estão apresentadas na Tabela 2A.

Quando analisadas as características entre os grupos é possível verificar inicialmente que os grupos são diferentes entre si. Em relação à massa corporal, observamos que o grupo que iniciou a suplementação com o probiótico apresenta maior massa corporal quando comparado com o grupo que iniciou com placebo (86,7±8,44 vs 72,0±3,49, *p<0,05 *B. lactis* HN019 Antes (n=4) vs Placebo Antes (n=4) e essa diferença se manteve em todos os momentos da pesquisa.

O grupo que finalizou suplementação com probiótico apresentou maior massa corporal quando comparado ao grupo que finalizou o período com o placebo (86,3±8,50 vs 71,5±2,57, # p<0,05 *B. lactis* HN019 Depois (n=4) vs Placebo Depois (n=4),

Após o período de *wash-out* de 4 semanas a massa corporal se manteve estatisticamente diferente entre os dois grupos. O grupo que iniciou placebo apresentou massa corporal maior que o grupo que iniciou probiótico no segundo período (86,2±8,25 vs 70,8±2,69, \$ p<0,05 Placebo Antes (n=4) vs *B. lactis* HN019 Antes (n=4).

Por fim, o grupo que finalizou o placebo manteve-se maior em relação à massa corporal do grupo que finalizou com probiótico (85,9±9,50 vs 71,1±3,65, & p<0,05 Placebo Depois (n=3) vs *B. lactis* HN019 Depois (n=4).

Mas quando se calculou o IMC, essa diferença permaneceu somente em um grupo. O valor foi estatisticamente maior em relação ao período após o *wash-out* quando se compara quem recebeu placebo nesse último período do que no grupo

que recebeu probiótico nesse período (31,6±1,07 vs 28,7±1,28, @ p<0,05 Placebo Depois (n=3) vs *B. lactis* HN019 Depois (n=4).

Quanto ao perímetro abdominal, também foi observada diferença entre os grupos durante todo o período de suplementação.

O grupo que iniciou a suplementação com o probiótico apresentou maior perímetro abdominal quando comparado com o grupo que iniciou a suplementação com o placebo (104,5±3,87 vs 96,0±3,16, *p<0,05 *B. lactis* HN019 Antes (n=4) vs Placebo Antes (n=4), se mantendo durante toda a pesquisa.

O grupo que finalizou suplementação com probiótico apresentou maior perímetro abdominal maior quando comparado ao grupo que finalizou o período com o placebo (104,5±3,87 vs 96,0±3,16, #p<0,05 *B. lactis* HN019 Depois (n=4) vs Placebo Depois (n=4),

Após o período de *wash-out* de 4 semanas o perímetro abdominal se manteve estatisticamente diferente entre os dois grupos. O grupo que iniciou placebo apresentou maior perímetro abdominal que o grupo que iniciou probiótico no segundo período (104,5±3,87 vs 96,0±3,16, \$p<0,05 Placebo Antes (n=4) vs *B. lactis* HN019 Antes (n=4).

E ainda o grupo que finalizou a suplementação com placebo manteve-se maior em relação à média do perímetro abdominal do grupo que finalizou com probiótico (105,3±4,16 vs 96,2±3,10, & p<0,05 Placebo Depois (n=3) vs *B. lactis* HN019 Depois (n=4).

Os dados estão demonstrados na tabela abaixo:

Tabela 2A. Características demográficas e antropométricas

| | Placebo | | <i>B. lactis</i> HN019 | | <i>B. lactis</i> HN019 | | Placebo | |
|---------------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|---------------|----------------|---------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois | Antes | Depois | Antes | Depois |
| N total | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| Gênero F/M | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/1 |
| Idade (anos) | 55,2 ± 2,22 | 55,2 ± 2,22 | 55,2 ± 2,22 | 55,2 ± 2,22 | 52,2 ± 3,92 | 52,2 ± 3,92 | 52,2 ± 3,92 | 52,2 ± 3,92 |
| Tempo de doença (anos) | 9,1 ± 6,86 | 9,1 ± 6,86 | 9,1 ± 6,86 | 9,1 ± 6,86 | 14,2 ± 9,54 | 14,2 ± 9,54 | 14,2 ± 9,54 | 14,2 ± 9,54 |
| Massa Corporal (Kg) | 72,0 ± 3,49* | 71,5 ± 2,57# | 70,8 ± 2,69\$ | 71,1 ± 3,65& | 86,7 ± 8,44* | 86,3 ± 8,50# | 86,2 ± 8,25\$ | 85,9 ± 9,50& |
| IMC (Kg/m²) | 29,0 ± 1,59 | 28,8 ± 1,27 | 28,5 ± 1,08 | 28,7 ± 1,28® | 30,9 ± 1,67 | 30,8 ± 1,64 | 30,7 ± 1,88 | 31,6 ± 1,07® |
| Perímetro abdominal (cm) | 96,0 ± 3,16* | 96,0 ± 3,16# | 96,0 ± 3,16\$ | 96,2 ± 3,10& | 104,5 ± 3,87* | 104,5 ± 3,87# | 104,5 ± 3,87\$ | 105,3 ± 4,16& |

Legenda: IMC: Índice de Massa Corporal (Kg/m²). Placebo Antes (n=4). Placebo Depois (n=4). *B. lactis* HN019 Antes (n=4). *B. lactis* HN019 Depois (n=4). *B. lactis* HN019 Antes (n=4). *B. lactis* HN019 Depois (n=4). Placebo Antes (n=4). Placebo Depois (n=3). Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Massa corporal (Kg) e Perímetro abdominal (cm)

* $p < 0,05$ *B. lactis* HN019 Antes (n=4) vs Placebo Antes (n=4).

$p < 0,05$ *B. lactis* HN019 Depois (n=4) vs Placebo Depois (n=4).

§ $p < 0,05$ Placebo Antes (n=4) vs *B. lactis* HN019 Antes (n=4).

& $p < 0,05$ Placebo Depois (n=3) vs *B. lactis* HN019 Depois (n=4).

IMC (Kg/m²)

@ $p < 0,05$ Placebo Depois (n=3) vs *B. lactis* HN019 Depois (n=4).

B) Dados desconsiderando o estudo cruzado dos participantes

Os resultados apresentados abaixo representam o agrupamento dos participantes em dois grupos: todos que receberam probiótico e todos que receberam placebo, independente do período de suplementação.

Como observado acima, quando se compara as características demográficas e antropométricas (número de participantes, idade, gênero, tempo de doença, massa corporal, IMC e perímetro abdominal) dos indivíduos de forma separada observamos algumas diferenças entre eles, mas ao agrupar os resultados obtidos por grupo: probiótico ou placebo, notamos que essa diferença não permanece, indicando que o grupo é estatisticamente igual em todos os parâmetros.

Não houve diferença entre os grupos probiótico e placebo no início do estudo. Também não foram evidenciadas alterações significativas para os parâmetros de IMC, peso e perímetro abdominal no início do estudo e mesmo após o período de intervenção, tanto no grupo probiótico quanto no grupo placebo. Os dados estão apresentados na Tabela 2B.

Tabela 2B. Características demográficas e antropométricas

| | Placebo | | <i>B. lactis</i> HN019 | |
|---------------------------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| N total | 8 | 7 | 8 | 8 |
| Gênero F/M | 4/4 | 4/3 | 4/4 | 4/4 |
| Idade (anos) | 53.63 ± 3.42 | 53.14 ± 3.39 | 53.63 ± 3.42 | 53.63 ± 3.42 |
| Tempo de doença (anos) | 11.69 ± 8.16 | 9.93 ± 6.99 | 11.69 ± 8.16 | 11.69 ± 8.16 |
| Massa Corporal (Kg) | 79.09 ± 9.58 | 77.67 ± 9.58 | 78.79 ± 10.30 | 78.75 ± 10.11 |
| IMC (Kg/m²) | 29.89 ± 1.85 | 30.05 ± 1.84 | 29.75 ± 1.82 | 29.74 ± 1.76 |
| Perímetro abdominal (cm) | 100.25 ± 5.60 | 100.00 ± 5.97 | 100.38 ± 5.60 | 100.38 ± 5.60 |

Legenda: IMC: Índice de Massa Corporal (Kg/m²). Placebo Antes (n=8). Placebo Depois (n=7). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em média ± desvio padrão.

A Tabela 3B demonstra as características dos participantes em relação ao perfil glicêmico e lipídico nos dois grupos. Não houve diferenças significativas nas medidas bioquímicas, incluindo glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides.

Tabela 3B. Características do perfil glicêmico e lipídico

| | Placebo | | <i>B. lactis</i> HN019 | |
|----------------------------------|----------------|----------------|------------------------|----------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| N total | 8 | 7 | 8 | 8 |
| Glicemia de jejum (mg/dl) | 162.50 ± 61.91 | 175.29 ± 53.75 | 181.88 ± 48.48 | 174.13 ± 36.63 |
| Hemoglobina glicada (%) | 8.36 ± 1.01 | 8.93 ± 1.34 | 8.71 ± 1.11 | 8.65 ± 1.21 |
| Colesterol (mg/dl) | 195.19 ± 61.98 | 183.08 ± 44.03 | 183.63 ± 44.02 | 175.24 ± 43.77 |
| HDL-colesterol (mg/dl) | 44.41 ± 9.33 | 43.28 ± 9.85 | 42.49 ± 9.58 | 42.08 ± 8.29 |
| LDL-colesterol (mg/dl) | 116.50 ± 45.41 | 104.57 ± 39.61 | 99.63 ± 40.51 | 92.25 ± 29.41 |
| Triglicérides (mg/dl) | 172.39 ± 63.07 | 176.11 ± 34.20 | 207.38 ± 63.07 | 205.32 ± 90.10 |

Legenda: Placebo Antes (n=8). Placebo Depois (n=7). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em média ± desvio padrão.

A análise do consumo alimentar foi avaliada por meio do recordatório alimentar de 24 horas, através do cálculo feito no programa Dietbox, como está demonstrada na Tabela 4B. Não houve diferenças significativas entre o período inicial e final da suplementação nas médias de ingestão de nutrientes (energia, proteínas, carboidratos e lipídios) entre os grupos. Embora o grupo que consumiu probiótico tenha apresentado redução na ingestão de carboidratos em gramas (254.87 ± 196.42 para 148.65 ± 36.39), não foi possível observar diferença significativa.

Tabela 4B. Análise do consumo alimentar

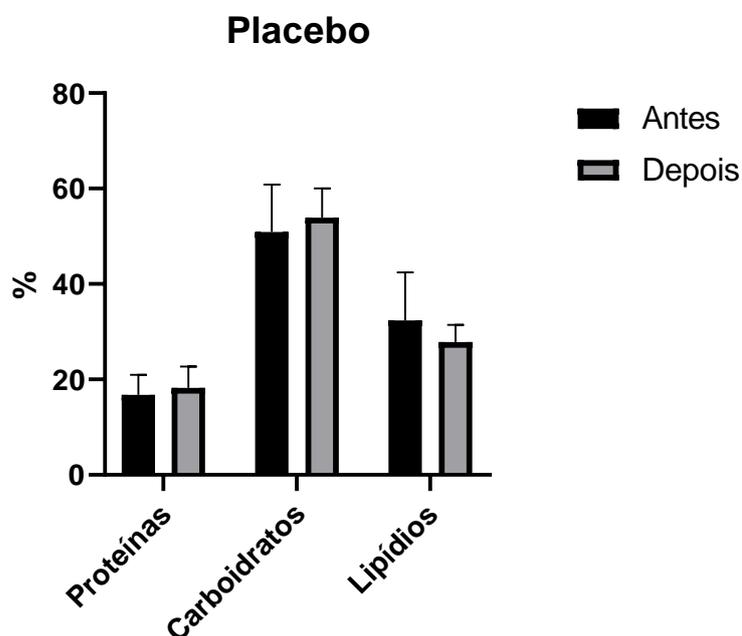
| | Placebo | | <i>B. lactis</i> HN019 | |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| N total | 8 | 7 | 8 | 8 |
| Energia (Kcal/dia) | 1513.71 ± 413.37 | 1201.79 ± 437.60 | 1750.97 ± 1018.28 | 1398.15 ± 391.44 |
| Proteínas (g/dia) | 61.85 ± 15.56 | 53.74 ± 19.35 | 65.55 ± 15.53 | 75.66 ± 43.65 |
| Carboidratos (g/dia) | 188.84 ± 45.61 | 165.64 ± 67.69 | 254.87 ± 196.42 | 148.65 ± 36.39 |
| Lipídios (g/dia) | 55.89 ± 31.08 | 36.88 ± 12.51 | 55.72 ± 33.65 | 55.33 ± 18.42 |

Legenda: Placebo Antes (n=8). Placebo Depois (n=7). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão.

A distribuição de macronutrientes em porcentagem de cada grupo pode ser observada nos gráficos abaixo, na Figura 3B e 4B.

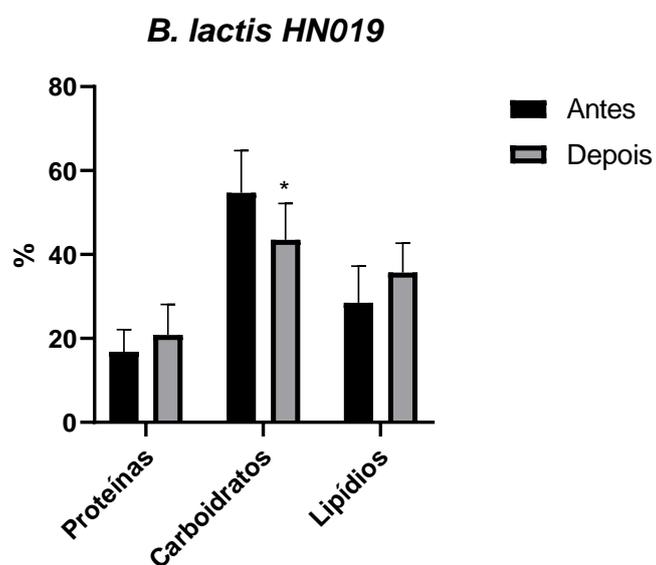
Não foi possível verificar diferença significativa entre os grupos em relação à porcentagem de proteínas e lipídios. Verificamos que a porcentagem de carboidratos no grupo que consumiu probiótico apresentou uma redução de aproximadamente 11% ($54,71 \pm 10,08$ para $43,49 \pm 8,7$, com $p < 0,05$ *B. lactis* HN019 Depois vs *B. lactis* HN019 Antes) após a suplementação. Essa diferença significativa não foi notada quando olhamos para o valor de consumo médio em gramas, somente quando comparamos os valores em porcentagem.

Figura 3B. Distribuição de macronutrientes no grupo placebo



Legenda: Placebo Antes (n=8). Placebo Depois (n=7). Dados expressos em média.

Figura 4B. Distribuição de macronutrientes no grupo probiótico



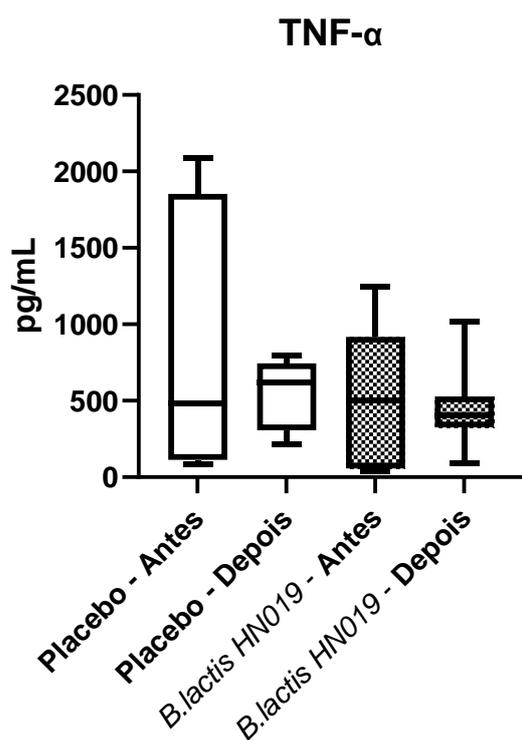
Legenda: *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em média.

*p<0,05 *B. lactis* HN019 Depois vs *B. lactis* HN019 Antes.

Em relação à avaliação da resposta imunológica dos indivíduos submetidos à suplementação, foram analisadas as concentrações das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ . A quantificação dos níveis dessas citocinas nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (linfócitos e macrófagos), obtidas dos participantes em níveis basais, na ausência dos estímulos LPS ou Con-A, foram indetectáveis pelo método empregado. Os resultados das culturas estimuladas com LPS (para TNF- α e IL-6) e as culturas estimuladas com Con-A (para IL-10 e IFN- γ) estão apresentados nas figuras abaixo.

Os níveis de TNF- α não apresentaram diferença significativa nos grupos probiótico e placebo, como demonstra a Figura 5B.

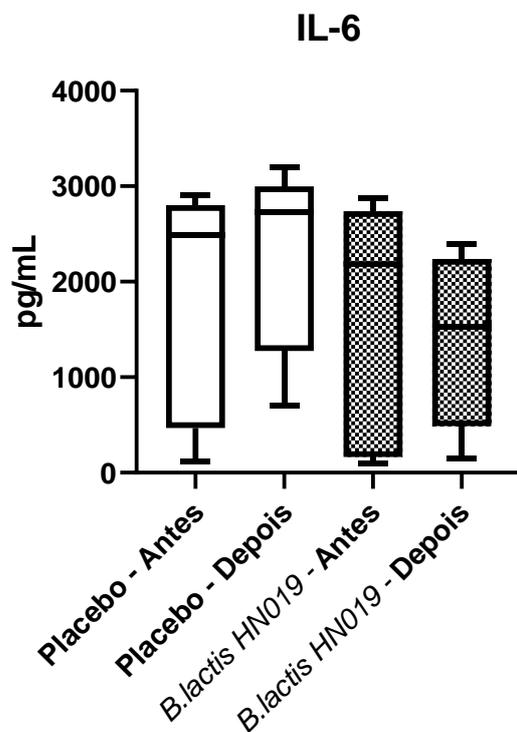
Figura 5B. Concentração de TNF- α em cultura de células



Legenda: Placebo Antes (n=7). Placebo Depois (n=5). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em mediana, mínimo e máximo.

Os níveis de IL-6 não apresentaram diferença significativa nos grupos probiótico e placebo, como demonstrado na Figura 6B.

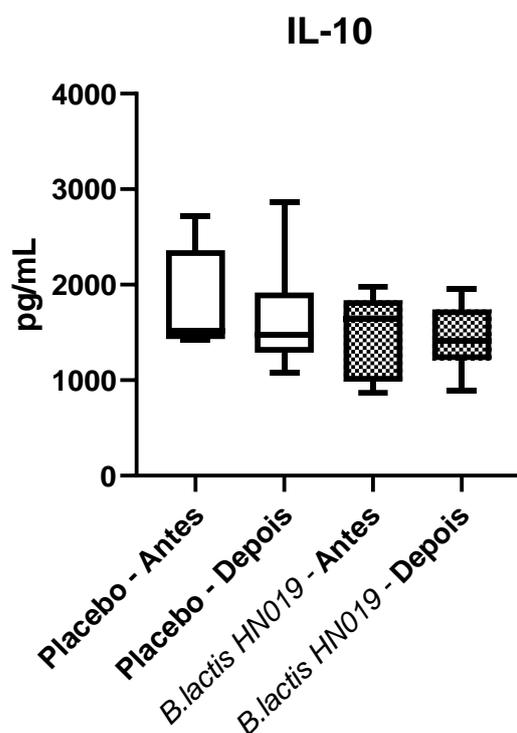
Figura 6B. Concentração de IL-6 em cultura de células



Legenda: Placebo Antes (n=6). Placebo Depois (n=5). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em mediana, mínimo e máximo.

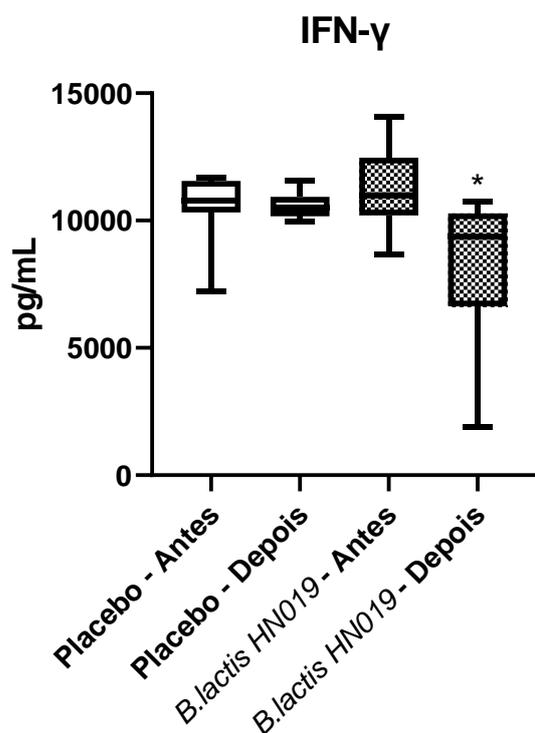
Os níveis de IL-10 também não mostraram diferença significativa nos grupos probiótico e placebo, como pode ser visto na Figura 7B.

Figura 7B. Concentração de IL-10 em cultura de células



Legenda: Placebo Antes (n=7). Placebo Depois (n=6). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em mediana, mínimo e máximo.

Já em relação aos níveis de IFN- γ podemos observar que após o consumo do probiótico o grupo apresentou redução significativa de aproximadamente 26% nos níveis de IFN- γ (11240,95+1671,63 para 8309,74+ 3004,77, com $*p<0,05$ *B. lactis* HN019 Depois vs *B. lactis* HN019 Antes), como demonstra a Figura 8B.

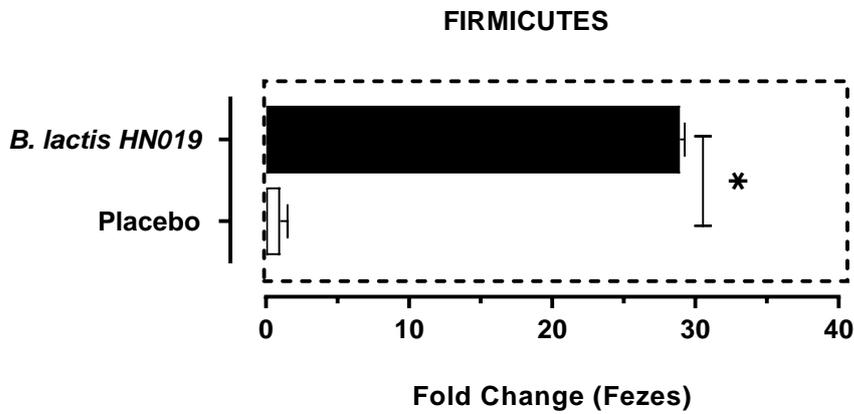
Figura 8B. Concentração de IFN- γ em cultura de células

Legenda: Placebo Antes (n=7). Placebo Depois (n=6). *B. lactis* HN019 Antes (n=8). *B. lactis* HN019 Depois (n=8). Dados expressos em mediana, mínimo e máximo. * $p < 0,05$ *B. lactis* HN019 Depois vs *B. lactis* HN019 Antes.

Quanto à avaliação da microbiota intestinal, a análise quantitativa dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, cuja população representa a maior parte das bactérias encontradas na microbiota humana, dos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia. foi realizada a partir das amostras de fezes dos participantes e está representada nas figuras abaixo, de acordo com cada filo (Figuras 9B, 10B, 11B, 12B, 13B).

O primeiro filo a ser apresentado é o Firmicutes, que engloba predominantemente bactérias gram-positivas. Podemos observar que o grupo que consumiu probiótico apresentou níveis aumentados de Firmicutes com diferença significativa em relação ao grupo que recebeu placebo (* $p < 0,0001$ *B. lactis* HN019 vs Placebo).

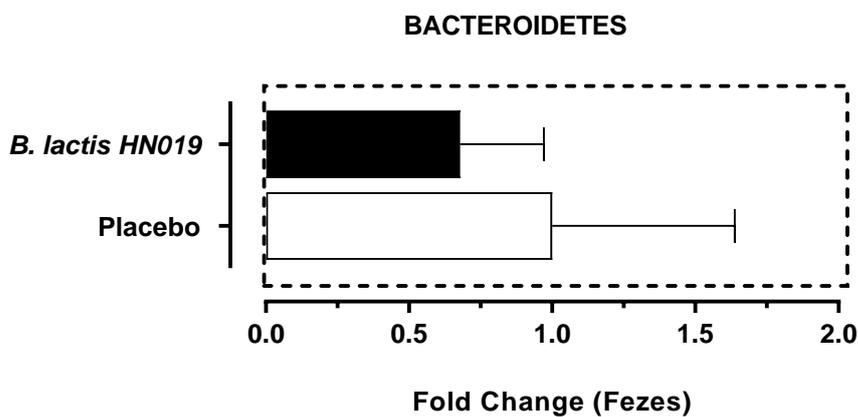
Figura 9B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Firmicutes



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,0001$ *B. lactis* HN019 vs Placebo.

O filo Bacteroidetes, representado em sua maioria por bactérias gram-negativas, não apresentou diferença significativa entre os grupos, como mostrado na Figura 10B.

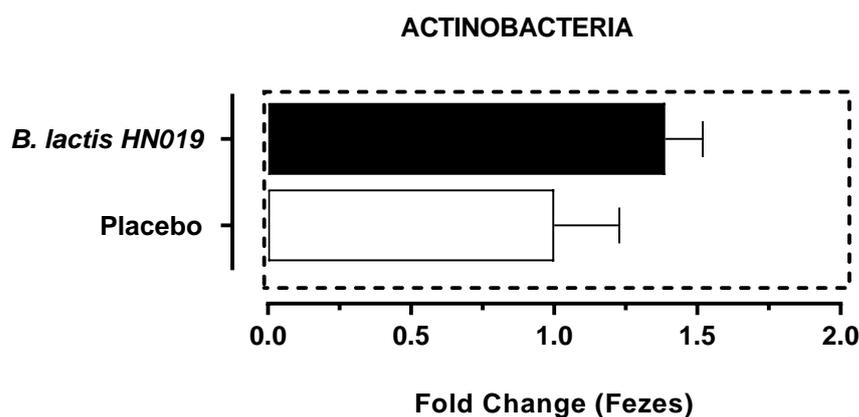
Figura 10B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Bacteroidetes



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão.

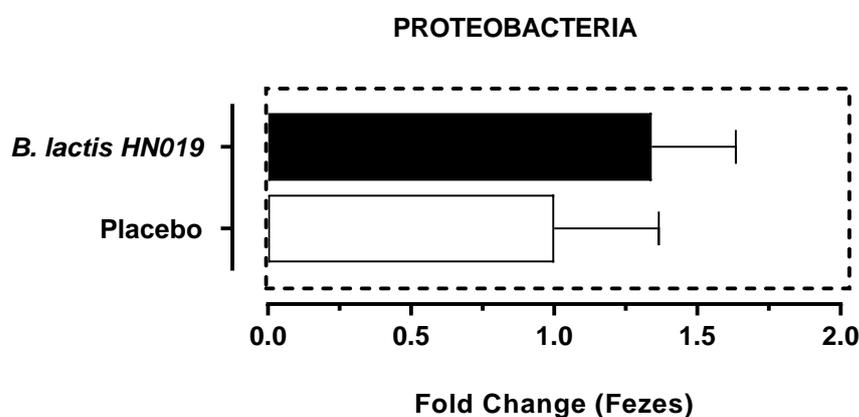
Em relação ao filo Actinobacteria e Proteobacteria, podemos observar que também não foi possível identificar diferenças entre os grupos probiótico e placebo, como demonstrado nas Figuras 11B e 12B, respectivamente.

Figura 11B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Actinobacteria



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão.

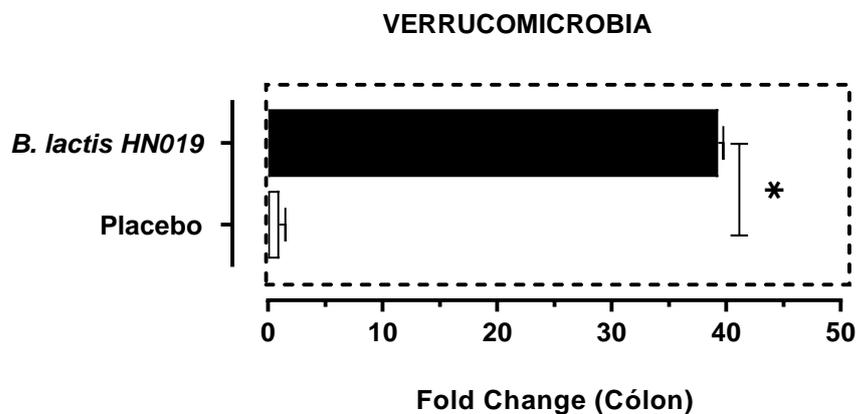
Figura 12B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Proteobacteria



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Já em relação ao filo Verrucomicrobia, podemos observar que houve um aumento significativo ($*p < 0,0001$ *B. lactis* HN019 vs Placebo) da abundância de bactérias do filo Verrucomicrobia no grupo que recebeu o probiótico e que não foi notada no grupo que recebeu placebo, como demonstrada na Figura 13B.

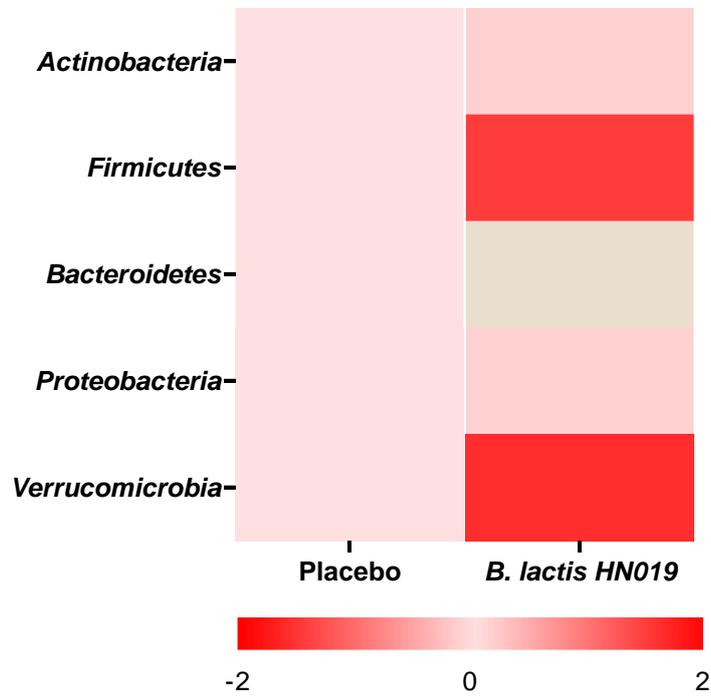
Figura 13B. Abundância de gêneros bacterianos do filo Verrucomicrobia



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8). Dados expressos em média \pm desvio padrão.
* $p < 0,0001$ *B. lactis* HN019 vs Placebo.

A Figura 14B abaixo representa o mapa da microbiota dos filios analisados. As diferentes cores representam a abundância relativa de bactérias nos grupos probiótico e placebo. A cor vermelha significa maior abundância relativa, enquanto a cor verde significa menor abundância. Os filios representados pela cor vermelha, Firmicutes e Verrucomicrobia, foram os mais abundantes nas amostras analisadas, quando comparados ao grupo placebo.

Figura 14B. Heatmap de abundância dos filos bacterianos



Legenda: Placebo (n=6). *B. lactis* HN019 (n=8).

5. DISCUSSÃO

A investigação do efeito da suplementação do probiótico *B. lactis* HN019 vem sendo amplamente estudado na saúde intestinal, investigando seus mecanismos de ação descritos em estudos experimentais e clínicos (SANDERS *et al.*, 2006).

A investigação apoia a hipótese de que *B. lactis* HN019 tem um papel benéfico na manutenção da função da barreira intestinal durante infecções gastrointestinais e atua na regulação da defesa imunológica do hospedeiro contra patógenos em estudos *in vitro* e em humanos (CHENG; LAITILA; OUWEHAND, 2021).

Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho apontam que as características dos participantes quando agrupados não apresentam diferença significativa em relação aos dois grupos nos parâmetros de massa corporal, IMC e perímetro abdominal, o que contraria os dados observado por Khalili e colaboradores (2019) que verificaram que o grupo de diabéticos que recebeu 10^8 UFC de *L. casei* por oito semanas diminuiu significativamente o peso corporal, o IMC e a circunferência da cintura.

Não foi possível verificar alterações significativas quanto ao perfil glicêmico, avaliado a partir das medidas de glicemia de jejum e hemoglobina glicada. Nota-se que a glicemia de jejum no grupo placebo apresentou um aumento de aproximadamente 7% ($162,50 \pm 61,91$ para $175,29 \pm 53,75$), enquanto no grupo suplementado com *B. lactis* HN019 a glicemia de jejum reduziu cerca de 4% ($181,88 \pm 48,48$ para $174,13 \pm 36,63$), mas essa redução não foi significativa na análise do grupo.

A hemoglobina glicada também apresentou o mesmo perfil, com ligeiro aumento no grupo placebo ($8,36 \pm 1,01$ para $8,93 \pm 1,43$) e uma redução mínima no grupo probiótico ($8,71 \pm 1,11$ para $8,65 \pm 1,21$). Estes resultados de perfil glicêmico corroboram com os resultados encontrados por Mazloom *et al.* (2013) e Ivey *et al.* (2014), pois também não observaram qualquer melhoria no controle glicêmico após a suplementação de probióticos. Por outro lado, a pesquisa desenvolvida por Toejing *et al.* (2021) avaliou a eficácia do consumo de *L. paracasei* HII01 por 12 semanas na glicemia de pacientes com DM2 e verificou que os níveis de glicemia em jejum diminuiram significativamente no grupo probiótico em comparação com o grupo

placebo. Além disso, Firouzi e colaboradores (2017) observaram que pacientes com DM2 que receberam probióticos (três cepas do gênero *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* e três cepas dos gêneros *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis* por 12 semanas obtiveram uma modesta redução nos valores de hemoglobina glicada após a suplementação, dados que contrariam os resultados encontrados neste estudo.

Neste trabalho, não foram avaliadas medidas que possibilitassem avaliação da resistência insulínica nos participantes, cujo valor é obtido pelo cálculo do índice HOMA-IR que leva em consideração a concentração de glicose em jejum e a quantidade de insulina produzida pelo organismo, podendo ser um indicativo de controle metabólico do diabetes, associado à medida de hemoglobina glicada. Sendo esse um fator limitante deste estudo no que se refere à avaliação do perfil glicêmico.

Quanto ao perfil lipídico, podemos observar que não houve nenhuma alteração significativa nos valores de colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides após a suplementação com o probiótico, corroborando com os resultados observados por Eliuz Tipici *et al.* (2023) que também não identificaram nenhuma alteração no perfil lipídico de mulheres que consumiram *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53.103 durante 8 semanas. No entanto, Mohamadshahi *et al.* (2014) demonstraram que indivíduos que consumiram 300 g/dia de iogurte probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 durante 8 semanas apresentaram diminuição significativa na relação LDL-c/HDL-c. E os níveis de HDL-c aumentaram significativamente no grupo probiótico. No entanto, não houve diferenças significativas nos níveis de triglicérides e colesterol total entre os dois grupos pós-intervenção.

No presente estudo, não houve alterações na ingestão de energia, proteínas, carboidratos e lipídios quando observamos os resultados medidos em kilocalorias ou gramas, o que é um fator importante para que não seja confundidor de qualquer efeito observado. Porém ao ser demonstrada a distribuição de macronutrientes em valores percentuais, observa-se que a ingestão de carboidratos no grupo que recebeu *B. lactis* HN019 reduziu ($54,71 \pm 10,08$ para $43,49 \pm 8,7$) representando uma redução de aproximadamente 11% do total calórico diário. No entanto, o método

utilizado para avaliação foi o Recordatório Alimentar de 24 horas, que apresenta muitas vantagens principalmente porque é um instrumento rápido, de baixo custo e fácil aplicação, porém ainda são feitas críticas quanto a sua utilização na análise dietética em pesquisas clínicas (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2010). Nesse método, a informação obtida dos dados é influenciada pela habilidade do indivíduo em recordar, de forma precisa o consumo do alimento, assim como detalhar a quantidade da porção consumida, ou seja, pode ser um determinante crítico da qualidade do método (FISBERG; MARCHIONI; COLUCCI, 2009), podendo causar um viés na quantificação do consumo. Por esse motivo, esse resultado também pode refletir essa desvantagem do método utilizado na pesquisa, uma vez que não se tem um método ideal ou padrão-ouro para inquéritos dietéticos (SAMPAIO *et al.*, 2012).

É conhecido que a inflamação de baixo grau desempenha um papel importante na patogênese do diabetes e conseqüentemente alguns marcadores inflamatórios geralmente podem ser encontrados em níveis mais elevados em pacientes com DM2 quando comparados a indivíduos saudáveis.

Uma teoria comum é que o LPS deriva das membranas externas de bactérias Gram-negativas, que são conhecidas por induzir endotoxemia metabólica ao promover a secreção de citocinas pró-inflamatórias (CANI *et al.*, 2007). Dessa forma, o LPS transloca-se através da barreira intestinal danificada, se liga ao receptor TLR4 e ativa o complexo TLR4/CD14, que ativa vias pró-inflamatórias. A exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, ativa as proteínas sinalizadoras que bloqueiam a ativação da cascata de sinalização da insulina nos órgãos-alvo, incluindo músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, levando à hiperglicemia, o que pode ser observado em pacientes com DM2 (ALLIN; NIELSEN; PEDERSEN, 2015).

Considerando essa interação, avaliamos então, os níveis das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ dos indivíduos com DM2 que receberam *B. lactis* HN019.

Podemos notar que não houve diferença significativa nos níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 em nenhum grupo. Os níveis de TNF- α apresentaram-se reduzidos após a suplementação de ambos os grupos, porém não de maneira significativa. Os valores de IL-6 apresentaram um perfil diferente do que observado nos níveis de TNF- α . Enquanto no grupo placebo os níveis de IL-6 aumentaram,

podemos ver que no grupo probiótico houve uma redução importante, no mesmo grau do aumento que observamos no grupo placebo, mas também essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os níveis de IL-10 também foram reduzidos em ambos os grupos, porém não existiu diferença entre eles.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Toejing *et al.* (2021) conseguiram observar que a suplementação com *L. paracasei* HII01 por 12 semanas foi capaz de diminuir o nível plasmático de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, quando comparado aos seus valores basais. Já o trabalho desenvolvido por Tonucci *et al.* (2017) identificou marcadores antiinflamatórios, como IL-10 e adiponectina. Porém foi observada redução de IL-10 após intervenção somente no grupo controle, enquanto a adiponectina não sofreu nenhuma alteração significativa em ambos os grupos.

A resistina e o TNF- α também tiveram valores diminuídos após a suplementação com 120 g/dia de leite de cabra fermentado contendo 10^9 UFC de *L. acidophilus* La-5 e 10^9 UFC de *B. lactis* BB-12 (TONUCCI *et al.* 2017).

No entanto, conseguimos verificar uma redução significativa dos níveis de IFN- γ após a suplementação com *B. lactis* HN019. Em indivíduos sem DM2 que receberam simbiótico contendo *L. rhamnosus* HN001, *B. lactis* HN019 e frutooligossacarídeo 500 mg/dia por 8 semanas, foi observado que a suplementação de simbióticos induziu uma queda de 19% no IFN- γ plasmático no grupo tratado com simbiótico, que foi significativamente diferente do placebo, como demonstrado por Li e colaboradores (2023).

Em condição de diabetes, há uma forte influência do IFN- γ , envolvida no metabolismo sistêmico da glicose. Estudos experimentais com camundongos deficientes em IFN- γ tiveram melhorias em sua tolerância à glicose, sendo atribuído à redução hepática de glicose e aumento da sensibilidade à insulina, possivelmente relacionada à redução da inflamação, ou seja, quanto menores os níveis de IFN- γ , melhor ocorre o metabolismo da glicose (WONG *et al.*, 2011; O'ROURKE *et al.*, 2012).

As evidências existentes sobre os impactos dos probióticos nos marcadores inflamatórios em populações com DM2 são limitadas e produzem resultados contraditórios e inconsistentes, uma vez que existe uma complexa regulação de citocinas, as quais podem estar relacionadas entre si, estimulando umas às outras,

ou ainda terem seus efeitos modulados por diferentes formas de acordo com cada cepa de probiótico utilizada.

No que se refere à análise da composição da microbiota intestinal, podemos identificar um aumento significativo expressivo ($p < 0,0001$) na abundância relativa de bactérias do filo Firmicutes. Quanto ao filo Bacteroidetes é possível notar que a quantidade de bactérias representada por esse filo é menor no grupo suplementado com *B. lactis* HN019 quando comparado ao grupo que recebeu placebo, porém essa redução não se deu de forma significativa. No geral, vários pesquisadores têm apresentado relações entre a obesidade e esses filios bacterianos dominantes, os Firmicutes e Bacteroidetes. Especificamente, tem sido observado uma mudança na abundância destes dois filios em pacientes obesos, tendo um aumento no filo Firmicutes e uma diminuição do filo Bacteroidetes, ou seja, padrão semelhante ao identificado na amostra do nosso estudo, pois são indivíduos com um nível de sobrepeso ou obesidade grau I que apresentam esse mesmo perfil (SCHWIERTZ *et al.*, 2010; TURNBAUGH *et al.*, 2009).

A abundância dos filios Actinobacteria e Proteobacteria não sofreu alteração em nenhum dos grupos.

Embora o probiótico oferecido na cápsula, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019, seja pertencente ao filo Actinobacteria não observamos aumento significativo após a suplementação, avaliada através da amostra de fezes. Esse resultado pode ser explicado possivelmente pelo fato de que as bactérias do gênero *Bifidobacterium* são facilmente fermentáveis e produzem ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o acetato, que apresenta níveis aumentados no intestino, sendo rapidamente absorvido e utilizado pelos colonócitos e também são transportados pelo sangue para os demais órgãos do corpo (OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, 2020).

Notou-se um aumento significativo ($p < 0,0001$) no grupo que recebeu suplementação com probiótico em relação ao filo Verrucomicrobia, representada principalmente por bactérias do gênero Akkermansia. Um destaque para *Akkermansia muciniphila*, cuja espécie é a mais encontrada dentro desse gênero, mas que não fizemos análise específica para determinação da mesma. Podemos inferir que seja a espécie mais abundante deste filo e que algumas pesquisas têm demonstrado o impacto benéfico de *A. muciniphila* na prevenção e melhoria de

parâmetros metabólicos em DM2, podendo ser usada como um indicador para avaliar o estado metabólico corporal, incluindo a homeostase da glicose e a distribuição de adipócitos em humanos, favorecendo a perda de peso (XU *et al.*, 2020).

No trabalho desenvolvido por Greer e colaboradores (2016) foi discutido o elo entre a microbiota intestinal, o metabolismo da glicose e o IFN- γ . O efeito dessa citocina está sendo relacionada à tolerância à glicose, sendo mediado por *A. muciniphila*. Foi observado que *A. muciniphila* está reduzida em camundongos e pacientes obesos, e a restauração de seus níveis melhora o metabolismo da glicose em modelos de camundongos com doença metabólica. O estudo de Greer *et al.* (2016) previu que *A. muciniphila* atua como um candidato chave para melhoria da tolerância à glicose em camundongos deficientes em IFN- γ . Os roedores que receberam IFN- γ apresentaram tolerância à glicose significativamente pior do que os controles, coincidente com uma diminuição na abundância dos níveis de *A. muciniphila*, o que leva a demonstrar a capacidade do IFN- γ para regular os níveis de *A. muciniphila*, bem como a tolerância à glicose, mas não descartam a possibilidade de estes dois efeitos serem independentes.

Esses resultados fortalecem as evidências de que o aumento significativo de bactérias do filo Verrucomicrobia, representado principalmente pelo gênero Akkermansia, observado neste presente estudo, associado à diminuição significativa de IFN- γ , leva a supor que o probiótico *B. lactis* HN019 foi capaz de aumentar *A. muciniphila* e consequentemente reduzir os níveis de IFN- γ , desempenhando um papel importante na regulação do metabolismo da glicose em indivíduos com DM2.

Algumas limitações da pesquisa foram o tamanho da amostra e a restrição do tempo em virtude da pandemia.

O tamanho da amostra comprometeu significativamente os resultados da pesquisa. A amostra foi muito pequena e foi difícil encontrar conexões significativas nos dados, pois os testes estatísticos exigem uma amostra maior para garantir uma representação mais forte, fornecendo boa evidência científica, sendo esse o principal fator limitador do estudo. A dificuldade inicial foi de encontrar participantes que se enquadrassem nos critérios de inclusão, pois nossa busca inicial foi através do Ambulatório de Diabetes e Cirurgia Bariátrica que acontece no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP/USP, porém ao iniciar a busca observamos que

estes pacientes já apresentavam complicações crônicas do diabetes e que seria inviável estudar esse público. Então, a decisão foi estender o convite aos colaboradores do HC, por meio de e-mail institucional e cartazes distribuídos pelo hospital. E por fim, foi aberta a divulgação à população em geral por das mídias sociais como Facebook e Instagram do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

O segundo fator limitante da pesquisa foi devido à pandemia de COVID-19. As dificuldades práticas e por imprevistos do desenvolvimento da pesquisa limitaram o tempo disponível para viabilizar o retorno das atividades e uma nova seleção de amostra.

Em conclusão, os resultados do presente estudo fornecem evidências de que a suplementação de *B. lactis* HN019 por 12 semanas em indivíduos com DM2 foi capaz de alterar significativamente a ingestão média de carboidratos, os níveis de IFN- γ , associados à alteração na composição da microbiota intestinal com destaque para aumento de bactérias do filo Firmicutes e do filo Verrucomicrobia.

Sendo assim, há necessidade de mais investigações futuras sobre como os probióticos podem atuar na patogênese do diabetes tipo 2. Buscando alternativas que visam melhorias no controle glicêmico, atuação em vias inflamatórias que reduzam ação das citocinas pró-inflamatórias e alteração da composição da microbiota intestinal, favorecendo o aumento de bactérias benéficas para o organismo.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, avaliamos o efeito da suplementação de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 em indivíduos com diabetes tipo 2, no controle metabólico do diabetes e vimos que o probiótico não foi capaz de alterar os níveis basais de forma significativa após a suplementação. No que se refere às características do perfil lipídico e medidas antropométricas observamos que esses parâmetros também não sofreram alteração após o consumo do probiótico.

O consumo do probiótico *B. lactis* HN019 foi capaz de reduzir os níveis de IFN- γ , associado à um aumento de bactérias do filo Verrucomicrobia e Firmicutes. Além de ter sido observada uma redução de aproximadamente 11% do teor de carboidratos em relação ao valor calórico total diário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAM, A.H. **Celular and molecular immunology**. 5th ed., Philadelphia, Saunders, 2003, p.1-366.

AIRAKSINEN, K. *et al.* The effect of a probiotic blend on gastrointestinal symptoms in constipated patients: a double blind, randomised, placebo controlled 2-week trial. **Benef Microbes**. 2019 Jul 10;10(6):617-627. doi: 10.3920/BM2018.0163. Epub 2019 May 27. PMID: 31131616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31131616/> Acesso em: 20 setembro 2023.

AKRAM KOOSHKI, A.; TOFIGHIYAN, T.; RAKHSHANI, M. H. Effects of Synbiotics on Inflammatory Markers in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Glob J Health Sci**. 2015 Mar 26;7(7 Spec No):1-5. doi: 10.5539/gjhs.v7n7p1. PMID: 26153197; PMCID: PMC4803840. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4803840/> Acesso em: 19 setembro 2023

ALLIN, K.H; NIELSEN, T.; PEDERSEN, O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**. 2015 Apr;172(4):R167-77. doi: 10.1530/EJE-14-0874. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25416725. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25416725/> Acesso em: 15 setembro 2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos**. Guia nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301> Acesso em: 16 setembro 2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas**. Abril 2017.

ASEMI, Z. *et al.* Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on insulin resistance in pregnant women: a randomized controlled trial. **Eur J Clin Nutr**. 2013 Jan;67(1):71-4. doi: 10.1038/ejcn.2012.189. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23187955. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23187955/> Acesso em: 20 agosto 2023.

AUNE, D. *et al.* Dairy products and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. **Am. J. Clin. Nutr**. 2013, 98, 1066–1083. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23945722/> Acesso em: 14 agosto 2023.

BUENO, A.; CZEPIELEWSKI, M. O recordatório de 24 horas como instrumento na avaliação do consumo alimentar de cálcio, fósforo e vitamina D em crianças e adolescentes de baixa estatura. Revista De Microbiologia – **Rev Microbiol**. (2010). 10.1590/S1415-52732010000100008. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rn/a/Fs5xJGLQPR3rTN9X98YZXFm/abstract/?lang=pt> Acesso em: 21 agosto 2023.

CANI, P.D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**. 2007 Jul;56(7):1761-72. doi: 10.2337/db06-1491. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17456850. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456850/> Acesso em: 21 setembro 2023.

CHÁVEZ-CARBAJAL, A *et al.* Characterization of the Gut Microbiota of Individuals at Different T2D Stages Reveals a Complex Relationship with the Host. **Microorganisms**. 2020 Jan 10;8(1):94. doi: 10.3390/microorganisms8010094. PMID: 31936722; PMCID: PMC7022408. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936722/> Acesso em: 02 setembro 2023.

CHECA-ROS, A., *et al.* Current Evidence on the Role of the Gut Microbiome in ADHD Pathophysiology and Therapeutic Implications. **Nutrients**. 2021 Jan 16;13(1):249. doi: 10.3390/nu13010249. PMID: 33467150; PMCID: PMC7830868. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467150/> Acesso em: 13 setembro 2023.

CHENG, J.; LAITILA, A.; OUWEHAND, A. C. Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 Effects on Gut Health: A Review. **Frontiers in Nutrition**. Vol. 8. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.790561> Acesso em: 13 setembro 2023.

CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nat Rev Genet**. 2012;13(4):260–270. Published 2012 Mar 13. doi:10.1038/nrg3182. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg3182> Acesso em: 21 setembro 2023.

DE WALL MALEFYT, W. R. *et al.* Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**. 1991 Nov 1;174(5):1209-20. doi: 10.1084/jem.174.5.1209. PMID: 1940799; PMCID: PMC2119001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1940799/> Acesso em: 20 agosto 2023.

EJTAHED, H. S. *et al.* Effect of probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **J Dairy Sci**. 2011 Jul;94(7):3288-94. doi: 10.3168/jds.2010-4128. PMID: 21700013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700013/> Acesso em: 21 setembro 2023.

EJTAHED, H.S. *et al.* Gut Microbiota as a Target in the Pathogenesis of Metabolic Disorders: A New Approach to Novel Therapeutic Agents. **Horm Metab Res** 2016; 48(06): 349-358. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27203411/> Acesso em: 20 setembro 2023.

ELIUZ TIPICI, B. *et al.* Lactobacillus GG is associated with mucin genes expressions in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. **Eur J Nutr**. 2023

Aug;62(5):2155-2164. doi: 10.1007/s00394-023-03139-3. Epub 2023 Mar 30. PMID: 36997822. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36997822/> Acesso em: 02 setembro 2023.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.** 2002. Disponível em: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf> Acesso em: 03 setembro 2023.

FIROUZI, S., *et al.* Effect of multi-strain probiotics (multi-strain microbial cell preparation) on glycemic control and other diabetes-related outcomes in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Eur J Nutr** 56, 1535–1550 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1199-8> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26988693/> Acesso em: 05 setembro 2023.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 53 (5). Jul 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000500014> Acesso em: 20 março 2024.

GOMES, B. F.; ACCARDO, C. M. Mediadores imunoinflamatórios na patogênese do diabetes mellitus. **Einstein** (São Paulo), São Paulo, v. 1, eRB4596, fevereiro de 2019. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019RB4596 Disponível em: <https://journal.einstein.br/pt-br/article/mediadores-imunoinflamatorios-na-patogenese-do-diabetes-mellitus/> Acesso em: 20 setembro 2023.

GONÇALVES, M. A. P. **Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo.** 2014. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4516/1/PPG_21951.pdf Acesso em: 21 setembro 2023.

GREER, R. L. *et al.* Akkermansia muciniphila mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. **Nat Commun.** 2016 Nov 14;7:13329. doi: 10.1038/ncomms13329. PMID: 27841267; PMCID: PMC5114536. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27841267/> Acesso em: 20 setembro 2023.

HAMMAD, R. *et al.* T-Natural Killers and Interferon Gamma/ Interleukin 4 in Augmentation of Infection in Foot Ulcer in Type 2 Diabetes. **Diabetes Metab Syndr Obes.** 2021;14:1897-1908. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S305511> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8093190/> Acesso em: 21 setembro 2023.

HAMAMAH, S.; IATCU, O. C., COVASA, M. Nutrition at the Intersection between Gut Microbiota Eubiosis and Effective Management of Type 2 Diabetes. **Nutrients.** 2024Jan16;16(2):269.doi:10.3390/nu16020269.PMID:38257161;PMCID:PMC10820857. Disponível em <https://www.mdpi.com/2072-6643/16/2/269> Acesso em: 20 março 2024.

IATCU, C.O.; STEEN, A.; COVASA, M. Gut Microbiota and Complications of Type-2 Diabetes. **Nutrients**. 2021 Dec 30;14(1):166. doi: 10.3390/nu14010166. PMID: 35011044; PMCID: PMC8747253. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011044/> Acesso em: 19 setembro 2023.

IDF DIABETES (International Diabetes Federation), 10. ed. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/> Acesso em: 17 setembro 2023.

INVERNICI, M. M. *et al.* Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. **PLoS One**. 2020 Sep 22;15(9):e0238425. doi: 10.1371/journal.pone.0238425. PMID: 32960889; PMCID: PMC7508403. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32960889/> Acesso em: 03 setembro 2023.

IVEY, K. L. *et al.* The effects of probiotic bacteria on glycaemic control in overweight men and women: a randomised controlled trial. **Eur J Clin Nutr**. 2014 Apr;68(4):447-52. doi: 10.1038/ejcn.2013.294. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24569536. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24569536/> Acesso em: 08 setembro 2023.

KHALILI, L. *et al.* The effects of lactobacillus casei on glycemic response, serum sirtuin1 and fetuin-a levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **Iran Biomed J**. 2019 Jan;23(1):68-77. doi: 10.29252/23.1.68. Epub 2018 May 27. PMID: 29803203; PMCID: PMC6305821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29803203/> Acesso em: 14 setembro 2023.

KOBYLIAK, N., *et al.* Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: Randomized clinical trial. **Diabetes Metab Syndr**. 2018 Sep;12(5):617-624. doi: 10.1016/j.dsx.2018.04.015. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29661605. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29661605/> Acesso em: 10 setembro 2023.

LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G. C.; ABREU, A. O. Tecido adiposo, uma nova visão: as adipocinas e seu papel endócrino. **Rev Cient FMC**. 2016;11(2):25-31. Disponível em: <https://revista.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6> Acesso em: 18 setembro 2023.

LAI, H. *et al.* Effects of dietary fibers or probiotics on functional constipation symptoms and roles of gut microbiota: a double-blinded randomized placebo trial. **Gut Microbes**. 2023 Jan-Dec;15(1):2197837. doi: 10.1080/19490976.2023.2197837. PMID: 37078654; PMCID: PMC10120550. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37078654/> Acesso em: 14 setembro 2023.

LAUE, C. *et al.* Effect of a probiotic and a synbiotic on body fat mass, body weight and traits of metabolic syndrome in individuals with abdominal overweight: a human, double-blind, randomised, controlled clinical study. **Nutrients**. 2023 Jul 5;15(13):3039. doi: 10.3390/nu15133039. PMID: 37447365; PMCID: PMC10346309. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/13/3039> Acesso em: 16 setembro 2023.

LI, X. *et al.* Effect of synbiotic supplementation on immune parameters and gut microbiota in healthy adults: a double-blind randomized controlled trial. **Gut Microbes**. 2023 Dec;15(2):2247025. doi: 10.1080/19490976.2023.2247025. PMID: 37614109; PMCID: PMC10453972. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10453972/> Acesso em: 16 setembro 2023.

MARCHESI, J. R. The Human Microbiota and Microbiome – **Capítulo 9: The Gut Microbiota in Health and Disease**. 2017

MAZLOOM, Z.; YOUSEFINEJAD, A.; DABBAGHMANESH, M. H. Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: a clinical trial. **Iran J Med Sci**. 2013 Mar;38(1):38-43. PMID: 23645956; PMCID: PMC3642943. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23645956/> Acesso em: 13 setembro 2023.

MOHAMADSHAH, M. *et al.* Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. **J Res Med Sci**. 2014 Jun;19(6):531-6. PMID: 25197295; PMCID: PMC4155708. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25197295/> Acesso em: 20 agosto 2023.

MORAIS, M.B., JACOB, C.M. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **J Pediatr (Rio J)**. 2006;82(5 Suppl): S189-97. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jped/a/dVKBCJHBwHCZXS9rBnxcPzJ/?lang=pt&format=pdf> Acesso em: 20 março 2024.

MOROVIC, W. *et al.* Transcriptional and functional analysis of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* exposure to tetracycline. **Appl Environ Microbiol**. (2018) 84:e01999-18. doi: 10.1128/AEM.01999-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30266728/> Acesso em: 21 agosto 2023.

MUSCOGIURI, G. *et al.* Gut: a key player in the pathogenesis of type 2 diabetes? **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27892685/> Acesso em: 20 setembro 2023.

NAZ, S. *et al.* Association of interleukin 10 (IL-10) gene with type 2 diabetes mellitus by single nucleotide polymorphism of its promoter region G/A 1082. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**. 2020;30(4):285-289. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2020030714. PMID: 32894658. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32894658/> Acesso em: 20 setembro 2023.

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

OLIVEIRA, V. A. Ácidos graxos de cadeia curta, produtos do metabolismo da microbiota intestinal, protegem da lesão renal aguda. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

O'ROURKE, R. W. *et al.* Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN- γ knockout mice. **Metabolism**. 2012 Aug;61(8):1152-61. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.018. Epub 2012 Mar 3. PMID: 22386937; PMCID: PMC3457921. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22386937/> Acesso em: 19 setembro 2023.

OSTADRAHIMI, A. *et al.* Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Iranian Journal of Public Health**. 2015; 44(2):228-237. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905057/> Acesso em: 21 agosto 2023.

PASIN, G.; COMERFORD, K. B. Dairy Foods and Dairy Proteins in the Management of Type 2 Diabetes: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Advances in Nutrition**. 2015; 6(3):245-259. doi:10.3945/an.114.007690. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25979490/> Acesso em: 21 setembro 2023.

PETTO, J. *et al.* Adiponectin: characterization, metabolic and cardiovascular action. **Int J Cardiovasc Sci**. 2015;28(5):424-32. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/7f2b/a062da664b439544660d6bc54da6c04930be.pdf> Acesso em: 18 setembro 2023.

RODRIGUES, V. F. *et al.* *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: a good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes. **Front Immunol**. 2022 Jul 7;13:934695. doi: 10.3389/fimmu.2022.934695. PMID: 35874661; PMCID: PMC9300896. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35874661/> Acesso em: 19 setembro 2023.

SABICO, S. *et al.* Effects of a 6-month multi-strain probiotics supplementation in endotoxemic, inflammatory and cardiometabolic status of T2DM patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clin Nutr**. 2019 Aug;38(4):1561-1569. doi: 10.1016/j.clnu.2018.08.009. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30170781. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30170781/> Acesso em: 21 agosto 2023.

SADAGOPAN, A. *et al.* Understanding the role of the gut microbiome in diabetes and therapeutics targeting leaky gut: a systematic review. **Cureus**. 2023 Jul 8;15(7):e41559. doi: 10.7759/cureus.41559. PMID: 37554593; PMCID: PMC10405753. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37554593/> Acesso em: 14 setembro 2023.

SAMPAIO, L.R., *et al.* Inquérito alimentar. In: SAMPAIO, L.R., org. Avaliação nutricional [online]. Salvador: EDUFBA, 2012, pp. 103-112. Sala de aula Collection.

ISBN: 978-85-232-1874-4. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788523218744.0008> Acesso em: 20 março 2024.

SANDERS, M. E. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. **J Clin Gastroenterol.** 2006 Oct;40(9):776-83. doi: 10.1097/01.mcg.0000225576.73385.f0. PMID: 17016131. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17016131/> Acesso em: 15 setembro 2023.

SCHWIERTZ, A. *et al.* Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity** (Silver Spring). 2010 Jan;18(1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19498350. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19498350/> Acesso em: 21 setembro 2023.

SOLEIMANI, A. *et al.* Probiotic supplementation in diabetic hemodialysis patients has beneficial metabolic effects. **Kidney Int.** 2017 Feb;91(2):435-442. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.040. Epub 2016 Dec 4. PMID: 27927601 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27927601/> Acesso em: 20 setembro 2023.

TOEJING, P. *et al.* Influence of *Lactobacillus paracasei* HII01 supplementation on glycemia and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. **Foods.** 2021 Jun 23;10(7):1455. doi: 10.3390/foods10071455. PMID: 34201653; PMCID: PMC8303256. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201653/> Acesso em: 20 setembro 2023.

TONUCCI, L. B. *et al.* Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clin Nutr.** 2017 Feb;36(1):85-92. doi: 10.1016/j.clnu.2015.11.011. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26732026. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26732026/> Acesso em: 23 agosto 2023.

TSIAVOU, A. *et al.* Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). **Cytokine.** 2005 Jul 21;31(2):135-41. doi: 10.1016/j.cyto.2005.02.011. PMID: 15935691. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15935691/> Acesso em: 23 agosto 2023.

TURNBAUGH, P. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. Massachusetts: **Nature.** 2009 Jan 22;457(7228):480-4. doi: 10.1038/nature07540. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19043404; PMCID: PMC2677729. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19043404/> Acesso em: 20 agosto 2023.

VAZ, E. S. **Proporção Firmicutes/Bacteroidetes e a relação com a obesidade: uma revisão de literatura.** 2021. 26 f. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/handle/1/28418> Acesso em: 19 setembro 2023.

VERMELHO, A. B. *et al.* **Práticas de Microbiologia.** Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2006. Disponível em:

<https://farmatecaunicatolica.files.wordpress.com/2017/12/prc3a1ticas-de-microbiologia-vermelho.pdf> Acesso em: 15 setembro 2023.

WHO. **Global report on diabetes**. [Internet]. 2016. Available from: Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=EAB2B6BAA778F408FA71448EE2366932?sequence=1 Acesso em: 21 setembro 2023.

WONG, N. *et al.* Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. **Endocrinology**. 2011 Oct;152(10):3690-9. doi: 10.1210/en.2011-0288. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21791564. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21791564/> Acesso em: 20 setembro 2023.

XU, Y. *et al.* Function of *Akkermansia muciniphila* in obesity: interactions with lipid metabolism, immune response and gut systems. **Front Microbiol**. 2020 Feb 21;11:219. doi: 10.3389/fmicb.2020.00219. PMID: 32153527; PMCID: PMC7046546. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32153527/> Acesso em: 24 agosto 2023.

ZENG, Z. *et al.* *Lactobacillus paracasei* modulates the gut microbiota and improves inflammation in type 2 diabetic rats. **Food Funct**. 2021 Aug 2;12(15):6809-6820. doi: 10.1039/d1fo00515d. PMID: 34113945. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34113945/> Acesso em: 20 setembro 2023.

ZHAO, X. *et al.* *Akkermansia muciniphila*: A potential target and pending issues for oncotherapy. **Pharmacol Res**. 2023 Sep 9;196:106916. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106916. Epub ahead of print. PMID: 37690533.t. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37690533/> Acesso em: 17 setembro 2023.

8. ANEXOS

8.1 Anexo I – Aprovação Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

| | | |
|---|--|--|
|  | USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO |  |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | |
| DADOS DA EMENDA | | |
| Título da Pesquisa: Impacto do consumo de kefir no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2 | | |
| Pesquisador: Fabiana Tannhão | | |
| Área Temática: | | |
| Versão: 2 | | |
| CAAE: 70245417.5.0000.5440 | | |
| Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - | | |
| Patrocinador Principal: Financiamento Próprio | | |
| DADOS DO PARECER | | |
| Número do Parecer: 3.087.473 | | |
| Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto de pesquisa conforme carta datada de 10 de dezembro de 2018. | | |
| Objetivo da Pesquisa: Não modificado com a emenda. | | |
| Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não modificado com a emenda. | | |
| Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Justificativa da emenda: | | |
| 1. Adicionar um integrante à pesquisa, Áttila Vinicius Vitor Nobre, cujo profissional é dentista e pretende avaliar a qualidade da microbiota oral antes e após a suplementação com o kefir ou placebo para fins de comparação com a microbiota intestinal; | | |
| 2. Alterar o tempo de suplementação com o kefir ou placebo de 8 semanas para 12 semanas, justificada por muitos estudos que demonstraram importante papel do probiótico se consumido por um período regular variando de no mínimo 5 dias até 12 semanas de consumo; | | |
| 3. Incluir um desenho de estudo cross-over, adicionando o período de washout de 2 semanas após o período inicial de 12 semanas de suplementação. A vantagem desse tipo de estudo é que o | | |
| Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO CEP: 14.048-900 Bairro: MONTE ALEGRE UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO Telefone: (16)3033-2228 Fax: (16)3033-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br | | |

Página 01 de 03



Continuação do Parecer: 3.087.473

indivíduo é o seu próprio controle e a variabilidade é bem reduzida. O grupo experimental receberá kefir durante o período de 12 semanas. O grupo controle receberá iogurte tradicional na mesma quantidade e durante o mesmo período. Após um período de descanso de 2 semanas, haverá inversão dos grupos, aqueles que consumiram iogurte tradicional passarão a consumir kefir e vice-versa, por igual período de 12 semanas, nas mesmas proporções.

4. O relatório parcial de atividades foi incluído na Plataforma Brasil juntamente com este documento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados na emenda:

- relatório.docx;
- CARTA.docx;
- TCLE1.docx;
- Projeto.docx

Recomendações:

No TCLE versão 04/12/2018 não desmembrar as assinaturas do texto do termo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a emenda bem como o Projeto de pesquisa versão 04/12/2018 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 04/12/2018. O CEP tomou ciência do relatório parcial.

Considerações Finais a critério do CEP:

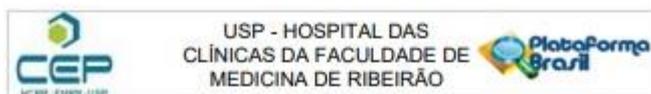
Emenda Aprovada: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB INFORMACOES_BASICAS_126715 0 É1.pdf | 10/12/2018 16:51:43 | | Aceito |
| Outros | relatorio.docx | 10/12/2018 16:51:05 | Fabiana Tannahão | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3632-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 12 de 13



Contribuição do Parecer: 3.087.473

| | | | | |
|--|-------------------------|------------------------|-----------------|--------|
| Outros | CARTA.docx | 10/12/2018 16:45:31 | Fabiana Tannhão | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Suscensão | TCLE1.docx | 10/12/2018 16:45:17 | Fabiana Tannhão | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.docx | 10/12/2018 16:45:01 | Fabiana Tannhão | Aceito |
| Orçamento | Orçamento.docx | 25/06/2017 16:32:22 | Fabiana Tannhão | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhadarostossinada.pdf | 25/06/2017 16:29:53 | Fabiana Tannhão | Aceito |
| Outros | Documento.pdf | 15/06/2017 16:11:53 | Fabiana Tannhão | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Dezembro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES WILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO CEP: 14.048-000
Bairro: MONTE ALEGRE
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3032-2228 Fax: (16)3033-1144 E-mail: cep@hop.usp.br

Página 03 de 03

9. APÊNDICES

9.1 Apêndice I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaria de convidá-lo(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **“Avaliação do efeito do consumo de *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 no controle metabólico, microbiota intestinal e na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2”**, conduzida por Fabiana Tannahão, que será realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O objetivo da pesquisa é avaliar o efeito do consumo do probiótico no controle metabólico e na resposta imunológica de indivíduos diabéticos tipo 2 com sobrepeso e obesidade grau I.

A participação nesta pesquisa consistirá em consumir uma cápsula contendo probióticos que deverão ser diluídos em água, uma vez ao dia. Os voluntários serão divididos, aleatoriamente, em dois grupos (experimental ou controle). Um grupo receberá a cápsula A e o outro grupo a cápsula B e ninguém saberá qual delas é o grupo experimental ou grupo controle. O período de consumo será de 12 semanas. O voluntário precisa disponibilizar um tempo para vir até o ambulatório a cada quinzena. Após um período de descanso de 2 semanas, haverá inversão dos grupos, aqueles que consumiram a cápsula A passarão a consumir a cápsula B e vice-versa, por igual período de 12 semanas, nas mesmas condições. Quanto ao consumo da cápsula, seu excesso poderá causar possível desconforto no trato gastrointestinal.

Informações pessoais serão obtidas por meio de entrevista. Todas as avaliações serão realizadas em dois momentos: ao início e ao final da pesquisa. Os participantes serão submetidos a uma avaliação clínica e nutricional, incluindo medição de peso, estatura e avaliação por bioimpedância elétrica. Haverá coleta de amostra de sangue, realizada por profissionais enfermeiros, para dosagem de hemograma e lipidograma completos. Também será solicitada uma amostra de fezes do voluntário para análise da microbiota intestinal. No momento da coleta de sangue poderá haver algum desconforto por causa da punção da pele ou da inserção da

agulha, mas em geral o procedimento é simples. Quanto à coleta das fezes, não há riscos associados.

Os benefícios esperados da pesquisa são: melhor controle glicêmico e metabólico, melhora da imunidade, assim como modulação da microbiota intestinal e parâmetros inflamatórios relacionados ao diabetes.

As informações obtidas na pesquisa serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Gostaria de deixar claro que você não pagará nem receberá por sua participação, sendo totalmente voluntária. A qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa ou desistência não acarretará prejuízo à sua pessoa. Caso ocorra alguma despesa financeira decorrente da pesquisa, os gastos serão ressarcidos (em forma de dinheiro) se forem comprovados especificamente devido à participação na pesquisa.

Os voluntários terão assistência e acompanhamento dos responsáveis pela pesquisa. Caso tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar (Fabiana Tannihão, Fone: (16) 99204-9623, E-mail: ftannihao@usp.br) ou (Maria Cristina Foss-Freitas, Fone: (16) 3602-2467, E-mail: crisfoss@fmrp.usp.br). Eventuais dúvidas, denúncias ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, deverão ser direcionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP por meio do telefone (16) 3602-2228.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma via do próprio participante e a outra via do pesquisador responsável.

Declaro que entendi o documento de consentimento e os objetivos do estudo, bem como os riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e fui esclarecido sobre todas as minhas dúvidas. E que concordo em participar.

Nome do voluntário

Assinatura do Voluntário (Favor rubricar todas as páginas deste termo)

Assinatura do Pesquisador

Data ____ / ____ / ____

9.2 Apêndice II – Triagem

TRIAGEM

| | |
|--|--------------------|
| Data: ___ / ___ / _____ | Registro HC: _____ |
| Nome: _____ | |
| Idade: _____ | |
| Peso Atual: _____ | Altura: _____ |
| Índice de Massa Corporal (Kg/m ²): _____ (inclusão = 25 a 35 Kg/m ²) | |
| Classificação: () Sobrepeso () Obesidade grau 1 | |
| Teve diagnóstico de diabetes tipo 2: () Sim () Não | |
| Há quanto tempo: _____ | |
| Qual medicamento utiliza? _____ | |
| Faz uso de insulina? () Sim () Não | |
| Qual: _____ | |
| Apresenta alguma dessas condições específicas de saúde? | |
| () Sim () Não | |
| () Hepatopatias agudas ou crônicas | |
| () Uso de anticoagulante ou imunossupressor | |
| () Gestante e/ou lactantes | |
| () Complicações crônicas do diabetes (retinopatia, neuropatia, nefropatia) | |
| Fez uso de antibióticos nos últimos 3 meses? () Sim () Não | |
| Qual: _____ | |
| Glicemia de jejum: _____ | |
| Hemoglobina glicada: _____ | |
| APTO PARA A PESQUISA: () Sim () Não | |

9.3 Apêndice III – Anamnese

ANAMNESE

DADOS PESSOAIS

Data: _____

Nome: _____ Idade: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefones:

Residencial () _____ Celular () _____

Qual sua escolaridade:

() Ensino Fundamental Completo

() Ensino médio completo

() Graduação

Profissão: _____

ANTROPOMETRIA

Peso Atual: _____ Altura: _____

Índice de Massa Corporal (Kg/m²): _____ (inclusão = 25 a 35 Kg/m²)

Classificação: () Sobrepeso () Obesidade grau 1

Perímetro abdominal: _____

HISTÓRICO FAMILIAR DE DOENÇAS

Antecedentes pessoais: _____

Antecedentes familiares: () DM () HAS () Câncer

Outros: _____

FUNÇÃO GASTROINTESTINAL

Presença de sintomas gastrointestinais:

() Gastrite () Azia

Urina (coloração, frequência): _____

Função Intestinal (frequência, consistência, esforço):

HISTÓRICO ATUAL

Peso Usual: _____

() Ganho de peso recente () Perda de peso recente

Quanto? _____ Há quanto tempo: _____

Uso de medicamentos: () Sim () Não

Quais: _____

Tabagismo (frequência, quantidade): _____

Etilismo (frequência, quantidade): _____

Atividade Física (tipo, frequência, duração): _____

É acompanhado por nutricionista? () Sim () Não

Faz alguma dieta específica? () Sim () Não

É acompanhado por outro(s) profissional(is)? () Sim () Não

Quais: _____

Observações: _____

—

9.4 Apêndice IV – Recordatório de 24 horas

RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24 HORAS

Nome: _____ Data: _____

| Refeições (horário, preparação ou alimentos) | Medida caseira e tamanho da porção | Valor em g/mL |
|---|---|----------------------|
| <i>Café da manhã</i> | | |
| | | |
| | | |
| <i>Lanche da manhã</i> | | |
| | | |
| | | |
| <i>Almoço</i> | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| <i>Lanche da tarde</i> | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| <i>Jantar</i> | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| <i>Antes de dormir</i> | | |
| | | |
| | | |