CAMILA DE SIQUEIRA CARDINELLI

Metabolômica fecal de pacientes obesos com diabetes tipo 2 submetidos a derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) com ênfase em ácidos biliares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cardinelli, Camila de Siqueira
Metabolômica fecal de pacientes obesos com diabetes tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) com ênfase em ácidos biliares / Camila de Siqueira Cardinelli. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Cirurgia bariátrica 2.Derivação gástrica 3.Diabetes mellitus tipo 2 4.Obesidade 5.Metabolômica

USP/FM/DBD-206/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM 35), da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O presente projeto de pesquisa recebeu o apoio financeiro da Fapesp:

Bolsa de Doutorado Direto processo nº 2014/05220-1

Nestlé Health Science

Dedico este trabalho aos **profissionais da área da saúde**, sobretudo *àqueles que buscam incessantemente respostas e soluções para o tratamento de doenças graves como o diabetes mellitus, obesidade e suas comorbidades.*

Dedico a todos os profissionais da saúde que enxergam seus pacientes de forma global e, acima de tudo, visam a qualidade de vida dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, por estar presente na minha vida, iluminando todo lugar onde eu piso e todas as escolhas que faço.*

*Às **pacientes do estudo**, que, com generosidade, aceitaram participar do protocolo de pesquisa.*

*Aos **pacientes**, vocês, sem dúvida, são meus maiores incentivadores e me fazem aprender a cada dia.*

*Ao meu orientador, querido Professor Doutor **Dan Linetzky Waitzberg**, fui muito feliz em aprender tanto com o senhor! O seu exemplo como profissional entusiasmado, dedicado, apaixonado pelo que faz, incansável aprendiz e líder exemplar, levarei por toda a vida. Meu grande exemplo de mentor, além de um ser humano maravilhoso. Obrigada por acreditar neste projeto e por ter estado sempre disponível para ensinar.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro ao projeto temático (2011/09612-3) e pela bolsa de doutorado que me foi concedida (DD 2014/05220-1).*

*À **Nestlé Health Science** pelo apoio financeiro na análise metabolômica targetet.*

*A todos os professores e funcionários da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP, que me acolheram no programa de pós-graduação. Especialmente à **Vilma de Jesus Libério**, pelo carinho e pela gentileza.*

A toda a equipe de cirurgia bariátrica do HC-FMUSP, que ajudou neste projeto em todos os momentos.

Aos meus pais, ***Domingos Cardinelli*** *e* ***Juliana de Siqueira Cardinelli****, por todo o amor imensurável. Obrigada, pai, pelo amor, por investir nos meus estudos, por me ajudar na criação do meu filho e por ter sido o primeiro a me apoiar quando decidi estudar na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Obrigada, mãe, por ser essa pessoa tão doce, alegre e serena. Minha fortaleza, meu exemplo de amor. Obrigada por me incentivar a estudar, por investir nos meus estudos, por cuidar tão bem do meu filho e por ter me apresentado de forma clara, com palavras e com seu exemplo, quem é Deus.*

Ao meu filho, ***Caio Lucca Cardinelli Giannini****, você é a minha melhor parte, meu maior amor. Simplesmente, obrigada por existir! Amor paciente e constante para a vida inteira, Deus te colocou na minha vida para me fazer evoluir a cada dia um pouco mais.*

Aos meus irmãos, ***Franciane Cardinelli Delaqua****,* ***Thierre de Siqueira Cardinelli*** *e* ***Lucas de Siqueira Cardinelli****. Obrigada por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e pelo amor mais puro e mais gratuito que pode existir. Ao meu sobrinho* ***Francisco Cardinelli Delaqua****, por alegrar os meus dias com seu sorriso, sua alegria contagiante.*

Ao meu querido e amado ***Jose Marcelo de Oliveira****, obrigada por tudo que você é, por todo incentivo, companheirismo, amizade e paciência. Obrigada por sempre se preocupar em tornar o meu caminho mais leve e por ter feito parte da realização deste sonho.*

À ***Camila Costa Oliveira****, pelo respeito e amizade.*

À tia ***Marina Cardinelli*** *(in memoriam), minha segunda mãe, que faz parte da minha história, Obrigada por tanto amor!*

À avó ***Ary Garcia de Siqueira*** *(in memoriam), por torcer e ter estado presente em todas as conquistas dos netos.*

*À tia **Arise Garcia de Siqueira Galil**, que fez eu descobrir o quanto é bom estudar. Ter trilhado este caminho foi muito mais do que conhecimento científico. Agradeço também ao tio **Jose Elias Galil**, por ter me indicado a pós-gradução do Ganep, em São Paulo.*

*À querida **Raquel Torrinhas**, muito obrigada por me ensinar e incentivar, corrigir minhas aulas, relatórios e artigos. Obrigada por tanta ajuda, entusiasmo, ensinamentos e amizade verdadeira ao longo destes anos.*

*À **Priscila Sala Kobal**, obrigada pela amizade, por todos os momentos de descontração que tivemos juntas, por me incentivar e por escutar minhas fosforilações sobre metabolômica fecal em várias madrugadas.*

*À **Natasha Machado**, que compartilha o conhecimento na área de metabolômica. Obrigada pela ajuda.*

*À **Graziela Ravacci**, obrigada por compartilhar seus conhecimentos de forma tão didática.*

*Às parceiras **Karina Al Assal**, **Mariane Marques** e **Samira Barcelos**, obrigada por dividirem comigo, todos estes anos, a responsabilidade das alíquotas de fezes e urina das pacientes do projeto.*

*À **Danielle Fonseca Candian**, obrigada por ser tão prestativa e colaborar com a execução do projeto.*

***Giliane Belarmino, Danielle Fontes**, **Rita Castro**, **Priscila Garla**, **Livia Rodrigues**, **Alweyd Tesser, Beatriz Ferreira**, **Ana Cristina Martinez** e **Bianca Balmant** e **Cristiane Verotti,** colegas que fiz no Metanutri, e que também participaram desta fase da minha vida, deixando boas lembranças e aprendizados.*

*Ao professor **Marcos Eberlin** e aos colegas **Marcos Pudenzi** e **Célio Figueiredo**, obrigada por me receberem no Laboratório ThoMson e participarem da concretização deste projeto.*

*Ao amigo **Leandro Ferreira**, que me auxiliou com muita paciência nas análises estatísticas.*

À equipe Metanutri, pela convivência diária e troca de experiências.

*Às colegas mais novas do LIM/35, **Beatriz Ferreira**, **Ana Cristina Martinez** e **Bianca Balmant**, obrigada pela parceria.*

A todos da equipe SURMetaGIT e do temático, muito obrigada pela parceria e convivência.

*Às professoras **Marina Tavares** e **Gizele Canuto**, obrigada por abrirem as portas do laboratório de vocês no IQ-USP.*

*Aos amigos da First Academia **Beto Moura, Rafael Ferfoglia**, **Alex Silva**, **Felipe Alves**, **Danilo Zogaib** e **John Anderson**, foi muito bom conviver com vocês estes anos em São Paulo.*

*À professora **Fernanda Toledo Piza**, obrigada pelo incentivo durante a graduação.*

*Ao **Francisco Balbino**, que, sempre com seu semblante alegre, manteve a organização do nosso laboratório.*

A todos os meus amigos e familiares, que torceram por mim e por vibrarem com as minhas conquistas.

“Um passarinho quando aprende a voar

sabe mais de coragem do que de voo.”

Autor desconhecido

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos
Lista de Figuras
Lista de Gráficos
Lista de Tabelas
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DA LITERATURA 4
1.1 Obesidade 5
1.2 Diabetes mellitus tipo 2 5
1.3 Cirurgia bariátrica no tratamento da obesidade e do DM2 6
1.4 Microbiota intestinal e formação de metabólitos 8
1.5 Metabólitos 10
1.6 Metabolômica 12
1.6.1 Abordagens de estudo em metabolômica 13
2.7 Metabolômica fecal 13
2.8 Metabolômica fecal após cirurgia bariátrica 16
2.9 Ácidos biliares 17
2.9.1 Conjugação e desconjugação de ácidos biliares 20
2.9.2 Circulação entero-hepática dos ácidos biliares 20
2.9.3 Ácidos biliares e microbiota 21
2.9.4 Ácidos biliares e ativação de receptores 26
2.9.4.1 Receptor X *Farnesóide* 26
2.9.4.2 Receptor 5 da proteína-G de Takeda 29
2.9.4.3 Ação conjunta de FXR e TGR5 30
2.9.5 Ácidos biliares e alterações metabólicas após DGYR 30
3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DE ESTUDO 32
3.1 Hipótese 32
3.2 Justificativa do estudo 32

4 OBJETIVOS 34
4.1 Geral 35
4.2 Específicos 35
5 MÉTODOS 36
5.1 Local de execução do trabalho 37
5.2 Aspectos éticos 37
5.3 Seleção de pacientes 37
5.4 Obtenção de consentimento informado 38
5.5 Desenho do protocolo de estudo 38
5.5.1 Composição corporal 39
5.5.2 Exames bioquímicos 40
5.5.3 Síndrome metabólica 41
5.5.4 Avaliação quantitativa e qualitativa a ingestão alimentar 41
5.5.5 Derivação gástrica em Y de Roux 42
5.6 Análise estatística dos dados clínicos e bioquímicos 44
5.7 Protocolo de estudo 44
5.7.1 Protocolo da coleta das amostras de fezes até a extração 45
5.7.2 Consulta para explicação da coleta de fezes 46
5.7.3 Coleta de amostras de fezes 46
5.7.4 Transporte das amostras da residência da paciente até o laboratório 46
5.7.5 Recebimento e processamento das amostras no LIM/35 46
5.7.6 Estocagem das amostras até a extração dos metabólitos 47
5.8 Análise metabolômica *untargeted* 47
5.8.1 Protocolo de extração dos metabólitos fecais 47
5.8.2 Análise dos metabólitos por espectrômetro de massas: estudo piloto 49
5.8.3 Processamento dos dados e estatística do estudo piloto 49
5.9 Análise metabolômica *targeted* 49
5.9.1 Ferramentas de software utilizadas 51
5.9.2 Pré-processamento de dados 51
5.9.3 Métodos estatísticos 52

5.9.3.1 Análises univariadas 52
6 RESULTADOS 54
6.1 Características descritivas da amostra 55
6.1.1 Variáveis antropométricas 55
6.1.2 Consumo alimentar 57
6.1.3 Resposta clínica 61
6.2 Análise metabolômica *untargeted* 63
6.3 Análise metabolômica *targeted* 66
6.3.1 Resposta geral do perfil de ácidos biliares à derivação gástrica a Y de Roux 66
6.4 Correlação entre ácidos biliares fecais e remissão de DM2 69
6.4.1 Remissão de diabetes mellitus tipo 2 69
6.4.2 Resposta do perfil de ácidos biliares à DGYR, de acordo com a remissão pós-operatória de DM2 70
6.4.3 Correlação entre ácidos biliares fecais e colecistectomia 76
6.4.3.1 Diferença no perfil de ABs fecais entre pacientes COLE *versus* NOCOLE de acordo com o tempo. Teste de *Mann Whitney* 77
6.4.3.2 Diferença no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes COLE de acordo com o tempo. Teste de *Mann-Whitney*. 79
6.4.3.3 Diferença no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes NOCOLE de acordo com o tempo 81
6.4.3.4 Alterações no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes COLE *versus* NOCOLE pelo teste ANOVA..... 85
6.4.4 Correlação entre ABs fecais e remissão do DM2 em pacientes NOCOLE 94
6.4.4.1 Perfil de ácidos biliares à DGYR, de acordo com remissão pós-operatória de DM2 em pacientes NOCOLE 95
6.4.4.2 Diferença no perfil de ABs fecais em pacientes NR NOCOLE de acordo com o tempo após a DGYR 97
6.4.4.3 Diferença no perfil de AB fecais em pacientes R COLE de acordo com o tempo 99
6.5 Resumo dos principais achados 106

7 DISCUSSÃO 108
7.1 Da contribuição científica e seus pontos fortes 109
7.2 Do método 110
7.3 Dos resultados 113
7.3.1 Resposta clínica da amostra 113
7.3.2 Análise metabolômica 114
7.3.2.1 Perfil de ABs fecais da amostra global de acordo com o tempo de DGYR 114
7.3.2.2 Alterações no perfil de ABs fecais intragrupo 115
7.3.2.3 Alterações no perfil de ABs fecais entre os grupos R e NR 118
7.3.2.4 Impacto da colecistectomia no perfil de ABs fecais antes e após a DGYR 120
7.3.2.5 Alterações no perfil de ABs fecais em pacientes R e NR NOCOLE antes e após a DGYR 121
7.3.3 Limitações 123
8 CONCLUSÃO 126
9 ANEXOS 129
10 REFERÊNCIAS 147
APÊNDICES

LISTAS

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
α	alfa
β	beta
±	mais ou menos
^{1}H	região 1 do hidrogênio
A	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)
AB	ácido biliar
ABP	alça biliopancreática
AC	alça comum
ADA	*American Diabetes Association*
ADP	adenosina difosfato
AL	alça alimentar
ALT	alanina aminotransferase
AMP	monofosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
APCI	ionização química de pressão atmosférica
ASBT	transportador de ácido biliar ileal
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
BARS	receptores de ácidos biliares
BHS	hidrolases de sais biliares
BP	*Blood Pressure*
BSEP	*Bile Salt Export Pump*
C	concha pequena
CA	ácido cólico
Ca	colher grande de servir arroz cheia
CA/CDCA	razão entre ácido cólico e ácido quenodeoxicólico

CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CB	cirurgia bariátrica
Cchá	colher de chá cheia
CCK	colecistoquinina
CDCA	ácido quenodeoxicólico
CE	eletroforese capilar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cg	concha grande
CG	cromatografia gasosa
CI	ionização química
CL	cromatografia líquida
Cm	centímetro
Cm	concha média
COLE	colecistectomizadas
Cp	copo tipo americano
Cpr	copo de requeijão
Cs	colher de sopa cheia
Csb	colher de sobremesa cheia
CT	colesterol total
CYP27A1	enzima 27-hidroxilase de esterol
CYP7A1	enzima 7α hidroxilase de colesterol
CYP7B1	gene oxisterol 7α-hidroxilase
DCA	ácido deoxicólico
DGYR	derivação gástrica em Y de Roux
dL	decilitro
DM	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
E	escumadeira cheia
EI	ionização de elétrons
EM	espectrometria de massas
EM-CL	espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida
ESI	ionização na modalidade de electrospray

EUA	Estados Unidos da América
FBP1	*fructose-1,6-biphosphatase*
FC	*Fold-change*
Fg	fatia grande
Fgf15	*Fibroblast growth factor 15*
FGF19	*Fibroblast growth factor 19*
FGFR4	Fator de crescimento fibroblasto 4
Fm	fatia média
Fp	fatia pequena
FXR	*Receptor* X *Farnesoide*
G	grama
G6Pase	glucose-6-phosphatase
GABA	ácido gama aminobutírico
GC	cromatografia gasosa
GCA	ácido glicocólico
GCDCA	ácido glicoquenodeoxicólico
GDCA	ácido glicodeoxicólico
GGT	gama-glutamiltransferase
GI	gastrintestinal
GJ	glicemia de jejum
GLCA	ácido glicólico
GLP1	peptídeo 1 ligado ao glucagon
GLP1R	receptor de peptídeo 1 ligado ao glucagon
GLP2	peptídeo 2 ligado ao glucagon
GUDCA	ácido glicoursodeoxicólico
H_2	dióxido de hidrogênio
H_2S	hidrogênio
HbA1c	hemoglobina glicada
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDCA	ácido hiodeoxicólico
HDL	lipoproteína de alta densidade
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HSD3B7	enzima 3β-hidroxiesteroide desidrogenase

Hybrid	detector híbrido
IBAT	transportador de ácido biliar ileal
ID	intestino delgado
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IMC	Índice de Massa Corporal
Ion trap	armadilha de íons
IQ	amplitude quartil
Kcal	caloria
KDa	kilodalton
kg	peso atual em quilos
Kg/m^2	quilo por metro quadrado
L	litro
LCA	ácido litocólico
LC-ESI-MS	MS espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida
LC-MS/MS	espectrometria de massas acoplada à cromatografia liquida
LDL	lipoproteína de baixa intensidade
LIM/35	Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo
LOD	limite de detecção
LXR	receptor X hepático
m/z	razão massa/carga
MALDI	ionização/dessorção a laser assistida por matriz
MCA.a	ácido alfa muricólico
MCA.b	ácido beta muricólico
MCA.o	ácido ômega muricólico
MDR	transportadores dependentes de ATP – cations orgânicos hidrofóbicos, IBAT – transportador de ácido biliar ileal
Mg	miligrama
Ml	mililitro
mm	milímetro
Mmol	milimol
MRM	monitoramento de reações múltiplas
MRP2	proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 2
MRP3	membro C da família 3 transportador ABC

MRP4	membro C da família 4 transportador ABC
MS	espectrometria de massas
MS/MS (triplo)	espectrometria de massas triplo quadrupolo
MS/TOF	espectrometria de massas/tempo de voo
MS-MS	espectrometria de massas em tandem
ng	nanograma
NH_3^+	amônia
NIST	*National Institute of Standards and Technology*
Nº	número
NOCOLE	não colecistectomizadas
NR	não responsivas
NTCP	carregador de soluto família 10 (cotransportador AB/sódio), membro 1
NTCP	proteínas cotransportadoras de sódio dependente de ácido biliar taurocólico
ºC	grau Celsius
OST	transportador de soluto orgânico
PCA	análise de componentes principais
Pchá	pires de chá
PEPCK	*phosphoenolpyruvate carboxykinase*
PKA	proteína quinase A
PLS	*Partial Least Squares*
PLS-DA	análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais
pmol	picomol
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
ps	pires de sobremesa cheio
PXR	receptor X pregnano
Q0	entrada de íons no sistema de espectrometria de massas
Q1	unidade que seleciona os íons recém-formados
Q2	célula de colisão, íons são fragmentados
Q3	unidade em que os íons selecionados são direcionados ao detector
QFA	questionário de frequência alimentar
R	responsivas

R24h	recordatório alimentar de 24 horas
R7d	registro alimentar de 7 dias
RI	resistência à insulina
RMN	ressonância magnética nuclear
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotação por minuto
RXR	receptor X do retinoide
SHP	parceiro heterodimérico
SHP	pequeno parceiro heterodimérico
SLC1042	transportador de ácido biliar ileal
SURMetaGIT	SURgically induced Metabolic effects on the Human GastroIntestinal Tract
T0	pré-operatório
T1	pós-operatório de 3 meses
T2	pós-operatório de 12 meses
T3	triidotironina
T4	tiroxina
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCA	ácido taurocólico
TCDCA	ácido tauroquenodeoxicólico
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TDCA	ácido taurodeoxicólico
TG	triglicerídeos
TGI	trato gastrintestinal
TGR5	*Takeda G-protein receptor 5*
TLCA	ácido taurolitocólico
TMCA.a.b	ácido tauromuricólico
TOF	tempo de voo
TOF/TOF	tempo de voo/tempo de voo
TSH	hormônio tireoestimulante
TUDCA	ácido biliar tauroursodeoxicólico
TUDCA	ácido tauroursodeoxicólico
UDCA	ácido ursodeoxicólico
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

VDR	receptor de vitamina D
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade
VNP	Virtual Nutri Plus
vs	versus
XC	xícara de café
Xch	xícara de chá

Figuras

Figura 1 - Metabólitos produzidos pela microbiota no cólon do hospedeiro. 9

Figura 2 - Figura ilustrativa dos fatores que interferem na produção de metabólitos..... 11

Figura 3 - Formação de metabólitos microbianos 14

Figura 4 - Impacto de metabólitos microbianos no intestino e na função imune 15

Figura 5 - Vias clássica e alternativa da biossíntese dos ácidos biliares em humanos. 19

Figura 6 - Reações enzimáticas por bactérias intestinais. 23

Figura 7 - Composição de AB na vesícula biliar e fezes 25

Figura 8 - Circulação entero-hepática e metabolismo do AB intestinal por hidrolases de sais biliares (BHS) expressando receptores ativados por ABs de bactérias intestinais no intestino, fígado e órgãos endócrinos. 28

Figura 9 - Desenho do protocolo de estudo, com descrição dos procedimentos gerais de exames e coleta de amostras 39

Figura 10 - Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR: anatomia gastrintestinal normal e alterada após DGYR 43

Figura 11 - Protocolo de coleta das amostras fecais 45

Figura 12 - Descrição da Coorte: Estudo-piloto 47

Figura 13 - Descrição da Coorte: Análise Metabolômica *Targeted* 50

Figura 14 - Ácidos biliares primários, secundários e terciários em amostras fecais de mulheres obesas, portadoras de DM2 após DGYR..... 68

Figura 15 - Diagrama Consort das amostras fecais analisadas, nos períodos pré-operatório (T0) e pós-operatórios de 3 (T1) e 12 (T2) meses, das pacientes dos grupos R e NR 70

Figura 16 - Diagrama de Consort das amostras fecais de pacientes COLE e NOCOLE 76

Figura 17 - Diagrama Consort das amostras fecais de pacientes NOCOLE classificadas como R e NR 95

Tabelas

Tabela 1 - Características antropométricas de pacientes na admissão, 3 meses e 12 meses após a DGYR 56

Tabela 2 - Alterações no consumo calórico e de macronutrientes por mulheres obesas submetidas à DGYR, conforme dados obtidos pela aplicação do registro alimentar de 7 dias..... 58

Tabela 3 - Alterações no consumo calórico e de macronutrientes por mulheres obesas submetidas à DGYR, conforme dados obtidos pela aplicação do recordatório alimentar de 24 horas 59

Tabela 4 - Dados de antropometria e bioquímicos de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes, 3 e 12 meses após a DGYR..... 62

Tabela 5 - *Fold-changes* significativos de ácidos biliares fecais obtidos aos 3 e 12 meses após a DGYR em comparação com os obtidos no período pré-operatório 69

Tabela 6 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, de mulheres responsivas (grupo R) à remissão do DM2 antes, após 3 e 12 meses de DGYR e suas comparações 71

Tabela 7 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, de mulheres não responsivas (grupo NR) à remissão do DM2 antes, após 3 e 12 meses de DGYR e suas comparações 72

Tabela 8 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 COLE *versus* NOCOLE antes e após 3 e 12 meses de DGYR..... 78

Tabela 9 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e DM2 do grupo COLE, no período pós-operatório de 3 meses *versus* período pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*..... 79

Tabela 10 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e com DM2, do grupo COLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* período pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann- Whitney*..... 80

Tabela 11 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e com DM2 do grupo COLE no período pós-operatório de 3 meses *versus* período pós-operatório de 12 meses de DGYR Teste de *Mann-Whitney* 80

Tabela 12 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 3 meses *versus* pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*..... 82

Tabela 13 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*..... *83*

Tabela 14 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR. Teste de *Mann-Whitney* 84

Tabela 15 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 entre os grupos R e NR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*..... 96

Tabela 16 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*..... 97

Tabela 17 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*..... 98

Tabela 18 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*..... 99

Tabela 19 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*..... 100

Tabela 20 - Níveis de AB fecais em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pós-operatório precoce *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR em pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney* 101

Quadros

Quadro 1 - Reações enzimáticas que conduzem a transformação de ácidos biliares primários em secundários 22

Quadro 2 - Definição de Síndrome Metabólica de acordo com *International Diabetes Federation* (IDF) 41

Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição de macronutrientes (g) ingeridos por mulheres obesas antes, 3 e 12 meses após a BDGYR, conforme dados obtidos por registro alimentar de 7 dias e recordatório alimentar de 24 horas 60

Gráfico 2 - Análise *untargeted* fecal de 10 pacientes obesas com DM2 nos 3 períodos da DGYR – PLS-Da Modo Positivo ... 64

Gráfico 3 - Análise *untargetes* de metabólitos fecais de 10 pacientes obesas com DM2 em 3 períodos da DGYR – PLS- Da Modo Negativo 65

Gráfico 4 - Comportamento de 10 ácidos biliares fecais nos períodos pré-operatório, pós-operatório de 3 e 12 meses de DGYR 67

Gráfico 5A - Razão CA/CDCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e período pré-operatório em mulheres R e NR após a DGYR..... 73

Gráfico 5B - Razão CA/CDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 e 3 meses em mulheres R e NR após a DGYR..... 74

Gráfico 5C - Ácido biliar TUDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e período pré-operatório em mulheres R e NR após a DGYR 75

Gráfico 6 - DCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE 86

Gráfico 7 - DCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE..... 87

Gráfico 8 - GDCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE..... 88

Gráfico 9 - GLCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE..... 89

Gráfico 10 - TLCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE 90

Gráfico 11 - TLCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pós-operatório de 3 meses de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE 91

Gráfico 12 - GCDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE 92

Gráfico 13 - GUDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 e 3 meses de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE 93

Gráfico 14 - CA/CDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon* 102

Gráfico 15A - TUDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon* 104

Gráfico 15B - TUDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon* 105

RESUMO

Cardinelli CS. *Metabolômica fecal de pacientes obesos com diabetes tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) com ênfase em ácidos biliares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A cirurgia bariátrica (CB) é um método efetivo para promover perda de peso sustentável. A Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) é uma modalidade de CB muito indicada para obesos graves, especialmente devido ao seu impacto positivo sobre alterações metabólicas como o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Apesar das altas taxas de melhora ou remissão, os mecanismos metabólicos pelos quais a DGYR influencia a glicemia ainda não são completamente conhecidos. Nesse sentido, os ácidos biliares (ABs) têm sido apontados como fatores determinantes, especialmente devido à sua potente ação no metabolismo sistêmico. Ao atuar como reguladores metabólicos, os ABs mediam a sinalização de diversos processos de utilização de substratos energéticos em diferentes órgãos. Assim, o aumento dos níveis plasmáticos de ABs – frequentemente observado após a DGYR – pode promover alterações metabólicas importantes e contribuir para a promoção da homeostase glicêmica. O aumento plasmático de ABs é acompanhado da alteração da excreção fecal, já previamente demonstrada em estudos experimentais. Atualmente, pouco se sabe sobre a metabolômica fecal e o perfil de ABs de seres humanos após a DGYR, bem como a sua influência na remissão pós-operatória do DM2. Nossa hipótese considera que a DGYR altera o perfil de metabólitos e de ABs fecais de mulheres obesas portadoras de DM2 e que isso pode estar relacionado com a melhora do DM2 pós-operatório. Recrutamos 20 mulheres obesas portadoras de DM2, candidatas à DGYR, em atendimento no Departamento de Cirurgia Digestiva do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da USP. Foram coletadas amostras de fezes no pré e pós-operatórios de 3 e 12 meses. As pacientes foram classificadas em responsivas (R) e não responsivas (NR) à remissão do DM2, de acordo com os critérios da American Diabetes Association (ADA). Variáveis clínicas e bioquímicas também foram avaliadas. Amostras fecais foram submetidas à: (1) análise metabolômica *untargeted* pela técnica de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS) (n=10), para identificar o perfil metabolômico global; e (2) análise metabolômica *targeted* para quantificação de ABs, realizada pela empresa Biocrates® (Innsbruck, Áustria) por LC-MS tandem. O software MetIDQTM foi aplicado para a exportação de dados. As análises estatísticas incluíram análise de componentes principais supervisionada PLS-DA, com auxílio do software Pirouette 3:11 e da plataforma on-line MetaboAnalyst 3.0. Diferentes métodos estatísticos foram aplicados: ANOVA, fold change, teste t de *student*, *Wilcoxon* e *Mann-Whitney*, para identificar diferenças nas concentrações de ABs fecais antes e após a DGYR. Os resultados indicam que a DGYR promoveu melhora nas variáveis clínicas e bioquímicas em todas as pacientes avaliadas, apesar de níveis de glicemia e hemoglobina glicosilada (HbA1c)

terem sido significativamente menores no grupo R. Identificamos alterações do perfil metabolômico global e redução significativa de 10 ABs fecais após a DGYR ($p \leq 0,05$). As mudanças em ABs fecais nos períodos pós-operatórios foram diferentes entre pacientes R e NR, com redução significativa em mais subfrações no grupo R, acompanhada de diferença significativa no comportamento temporal do ácido cólico (CA) e ácido quenodeoxicólico (CDCA). Isso também refletiu em mudanças na razão CA/CDCA e nos níveis de ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) entre os grupos ($\leq 0,05$). Pacientes submetidas à colecistectomia (COLE) apresentaram um perfil de ABs distinto do perfil das pacientes que não realizaram colecistectomia (NOCOLE). Concluímos que a DGYR promove alterações metabolômicas fecais com redução significativa na concentração de ABs. Essa redução foi diferente entre as pacientes R e NR e entre as pacientes COLE e NOCOLE.

Descritores: Cirurgia bariátrica, Derivação gástrica, Diabetes mellitus tipo 2, Obesidade, Metabolômica

ABSTRACT

Cardinelli CS. *Fecal metabolism of obese patients with type 2 diabetes undergoing gastric bypass in Y-Roux (DGYR) with emphasis on bile acids* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Bariatric surgery (BS) is an effective method to promote sustained weight loss. Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is highly indicated to severe obesity, especially due to its positive impact on metabolic complications like type 2 diabetes (T2D). Although the high rates of remission or improvements, the mechanisms by which RYGB influences glycemia are still not fully recognized. Therefore, bile acids (BAs) are being pointed as determinant factors, especially due to its potent action on systemic metabolism. BAs act as metabolic regulators by mediating signaling of several process, including substrate utilization in different organs. Thus, increased levels of plasma BAs – frequently observed after RYGB – could promote important metabolic alterations and contribute to glucose homeostasis. Increased plasma BAs is followed by alterations of fecal excretion, as was previously demonstrated by experimental studies. Nowadays, little is known about fecal global metabolomics and its BAs profile in human beings subjected to RYGB, as well as its influence on T2D remission. Our hypothesis considers that RYGB alters metabolomic and BAs profile of obese women with T2D and this could be related to postoperative glucose homeostasis. We recruited 20 obese women with T2D, candidates to RYGB, under attendance on the Digestive Surgery Department of Hospital das Clínicas, School of Medicine - University of São Paulo. Fecal samples were collected before, 3 and 12 months after RYGB. Patients were classified as responsive (R) and nonresponsive (NR) to T2D improvement, according the American Diabetes Association (ADA). Clinical and biochemical variables were also evaluated. Fecal samples were evaluated by: (1) *untargeted* metabolomic analysis, by using liquid chromatography gas spectrometry (LC-MS) (n=10), in order to determine global metabolomics profile; and (2) *targeted* metabolomic analysis by Biocrates® (Innsbruck, Áustria) to quantify BAs profile by tandem LC-MS. MetIDQTM software was applied to export data. Statistical analysis included supervised principal component analysis PLS-DA, by Pirouette 3:11 and the online platform MetaboAnalyst 3.0. Different statistical methods were applied: ANOVA, Fold change, teste t student, Wilcoxon and Mann Whitney, to identify diferences of fecal BAs concentrations before and after RYGB. Results indicate that RYGB induced improvement of clinical and biochemical variables in all patients, although glycemic levels were significantly lower on R group. Global metabolomic profile was altered, presenting a significant reduction of 10 fecal BAs after RYGB ($p \leq 0,05$). Changes on postoperative BAs profile were different between R and NR, with a significant decrease of BAs sub fractions on R group, including a significant change on cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) temporal behavior. This reflected on the CA/CDCA ratio and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) between groups

(≤0,05). Patients subjected to cholecystectomy (COLE), showed a distinct pattern of BAs profile in comparison with non cholecystectomized patients (NOCOLE). We concluded that RYGB promote fecal metabolomic alterations, followed by a significant reduction of BAs. This reduction was distinctive between R and NR and COLE and NOCOLE patients.

Descriptors: Bariatric surgery, Gastric by-pass, Type 2 diabetes mellitus, Obesity, Bile acid changes

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada grave problema de saúde pública. É uma doença multifatorial complexa que envolve fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida, incluindo sedentarismo e dieta desequilibrada [1]. O consumo excessivo de alimentos processados e ultraprocessados está diretamente associado com o aumento do desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes tipo 2 (DM2). Atualmente, tem sido sugerido que o processo de digestão desses tipos de alimento parece ter papel na homeostase glicêmica e no desenvolvimento do diabetes tipo 2, por alterar de maneira significativa a composição dos ácidos biliares e da microbiota intestinal de indivíduos obesos [2-8].

Os cuidados primários, como modificações dietéticas e de atividade física, frequentemente apresentam baixa aderência em longo prazo [9]. Nesse cenário, a cirurgia bariátrica (CB) é o tratamento mais eficaz atualmente disponível para a obesidade [10]. Taxas mais elevadas de controle e remissão do DM2 são obtidas com procedimentos bariátricos que incluem derivação gastrintestinal (GI), como a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) [11-14]. Essa técnica de CB inclui redução da capacidade gástrica e desvio do duodeno e de parte do jejuno do trânsito alimentar, promovendo remissão do DM2 em 83,3% a 90,6% dos pacientes, segundo metanálises [12-14]. Frühbeck G (2015) relata taxas de remissão do DM2 de 93% após 1 ano da DGYR [15].

Menor ingestão e absorção alimentares, em função de alterações cirúrgicas da DGYR, podem explicar a perda de peso corporal, mas não explicam, plenamente, o seu efeito na melhora em curto prazo do DM2. Benefícios clínicos associados a técnicas de CB que envolvem desvio intestinal como a DGYR parecem advir da extensão de seus reflexos, que impactam o sistema gastrintestinal e podem levar a efeitos sistêmicos, como a melhora do perfil glicêmico e lipídico. Entre eles, incluem-se alteração na secreção de hormônios intestinais, mudança no metabolismo de ácidos

biliares e alterações no perfil da microbiota intestinal [16-19]. Isso significa que metabólitos fecais podem contribuir significativamente para o entendimento dos efeitos metabólicos da DGYR, especialmente na remissão do diabetes tipo 2 [20].

A metabolômica é uma ciência ômica que utiliza técnicas analíticas para caracterizar e quantificar pequenas moléculas (metabólitos) em diferentes amostras biológicas, incluindo sangue, urina e fezes. Graças aos avanços na tecnologia de espectrometria de massas, o perfil de metabólitos fecais de pacientes submetidos à DGYR pode ser analisado. A grande vantagem da análise metabolômica fecal é a capacidade de integrar diferentes sinais, como, por exemplo, a partir das variáveis que compõem a DGYR, incluindo alterações anatômicas do trato GI, vias de sinalização que resultam em alterações na secreção de hormônios intestinais, mudança no metabolismo de ácidos biliares e alterações no perfil da microbiota intestinal, e correlacionar com variáveis bioquímicas como a homeostase glicêmica. Em conjunto, esses sinais geram metabólitos que podem refletir a condição biológica e do seu ambiente intestinal, oferecendo resultados que podem funcionar como marcadores preditivos de diagnóstico e prognóstico da DGYR, bem como blocos para a construção de novas terapias [1, 5, 10, 20-25].

Portanto, o estudo do perfil de metabólitos fecais em pacientes com obesidade grave e diabetes mellitus tipo 2, antes e após diferentes períodos de DGYR, permite conhecer parte das alterações metabólicas causadas pelo efeito multimodal desse procedimento cirúrgico, principalmente no que se refere às alterações envolvendo os ácidos biliares.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade

Definida como Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 30 kg/m^2 ou mais, a obesidade é a condição que afeta múltiplos órgãos e causa graves problemas de saúde. As comorbidades da obesidade podem ser fisiológicas ou psicológicas, alcançando desde a depressão até o diabetes, a hipertensão, a hiperlipidemia e o risco aumentado de câncer [26].

A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, mostrou que 57% das pessoas com mais de 18 anos de idade estão acima do peso, sendo que existe maior prevalência do sexo feminino (58,2%) quando comparado ao sexo masculino (56%). Portanto, a prevenção e o tratamento do sobrepeso e da obesidade, com intuito de reduzir a incidência de DM2, são de grande importância no cenário brasileiro e mundial[27].

É importante frisar que, apesar de a obesidade ser o principal fator para o risco de DM2, nem todos os portadores de obesidade ou com sobrepeso progridem com DM2, ou seja, o DM2 é doença heterogênea, que envolve fatores genéticos e ambientais em sua fisiopatologia [28].

2.2 Diabetes mellitus tipo 2

O Diabetes mellitus (DM) é problema de saúde pública que poderá atingir até 650 milhões de pessoas em 2040, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF). O aumento da incidência do DM2 [29] ocorre em conjunto com a elevada prevalência de obesidade. Em junção, essas

doenças crônicas aumentam ainda mais o número de hospitalizações, mortalidade e gastos [30, 31].

Além da obesidade, a incidência de DM2 está associada ao aumento do crescimento e envelhecimento populacional, à urbanização, à maior sobrevida dos pacientes e ao sedentarismo[29]. No Brasil, os dados epidemiológicos são preocupantes. Em 2015, cerca de 14 milhões de adultos apresentaram diabetes, e estima-se que essa doença possa atingir 23,3 milhões de adultos até 2035. O Brasil foi classificado como o quarto país com o maior número de casos de DM do mundo [32].

O DM2 é um distúrbio metabólico complexo que se caracteriza por resistência à insulina (RI) e hiperglicemia. Na fase inicial da doença, ocorre RI nos tecidos periféricos, que, em geral, é acompanhada por hiperinsulinemia. Já a hiperglicemia por período prolongado se relaciona com a disfunção das células beta pancreáticas, e pode ocorrer redução da capacidade de secreção de insulina devido à alta demanda promovida pela resistência a esse hormônio [33-35].

Programas para perda de peso envolvendo dieta, atividade física e mudanças comportamentais têm sido desenvolvidos para o manejo da obesidade e do diabetes [9]. Entretanto, essas estratégias têm sucesso limitado, especialmente em indivíduos com obesidade mórbida, cujo IMC é maior ou igual a 40 kg/m^2. Em contrapartida, a cirurgia bariátrica tem mostrado efetividade a curto e a longo prazo [19].

2.3 Cirurgia bariátrica no tratamento da obesidade e do DM2

A cirurgia bariátrica (CB) é método consistente para perda de peso em pacientes com obesidade grave, e pode promover resolução de diversas disfunções metabólicas associadas à obesidade [15].

Intervenções cirúrgicas bariátricas por via aberta e laparoscópica, como a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), a gastrectomia de *sleeve*

vertical e a banda gástrica ajustável, são as técnicas mais comumente realizadas [19]. Estas duas últimas são técnicas restritivas, as quais limitam o consumo alimentar devido à diminuição do tamanho do estômago, mas deixam o restante do sistema digestivo intacto. De maneira diferente, a DGYR envolve mecanismos restritivos e disabsortivos ao reduzir o tamanho do estômago e a reconstituição do trânsito intestinal em Y de Roux. Assim, favorece a perda de peso e promove benefícios metabólicos, que incluem a reversão ou atenuação do DM2, sem gerar deficiências nutricionais graves [10-12, 36].

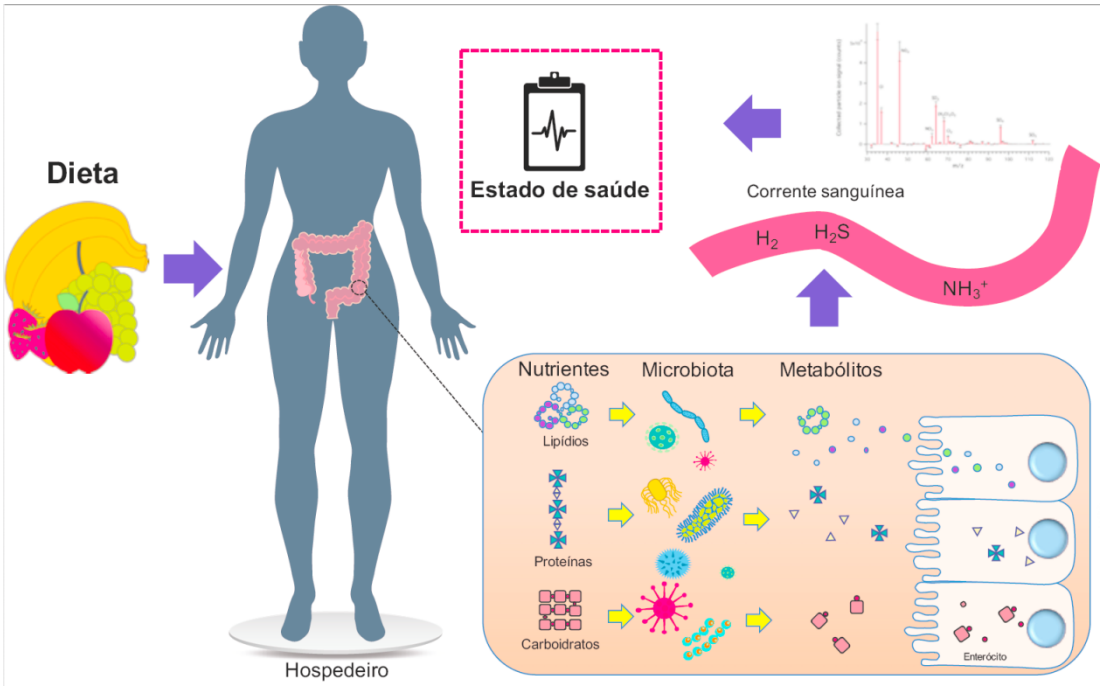
A melhora do DM2 após a DGYR é frequentemente observada antes de perda de peso significativa, e, muitas vezes, pacientes submetidos ao procedimento tornam-se independentes de medicamentos hipoglicemiantes já na alta hospitalar [37-40]. Apesar de padronizadas na maioria dos centros, algumas variações na técnica de DGYR podem influenciar seus resultados clínicos e metabólicos. Variações no tamanho da alça biliopancreática podem influenciar a intensidade e duração da melhora glicêmica, além dos índices de recidiva de DM2 [41-43]. Estudos de meta-análises mostraram que a DGYR resulta de 83,3% até 90,6% de remissão e/ou melhora do DM2 [19,44]. Graças ao benefício metabólico desse procedimento, a DGYR, além de terapêutica cirúrgica para perda de peso, também tem sido indicada para controle do DM2 associado à obesidade [44]. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela remissão do DM2 após a DGYR ainda não estão totalmente estabelecidos e têm impulsionado esforços para esclarecer o que poderia estar envolvido nesse processo [11- 14,16].

Atualmente, no Brasil, a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) é uma das técnicas cirúrgicas bariátricas mais praticadas. As mudanças anatômicas da DGYR e a modificação de hábito dietético podem modificar o microbioma intestinal [45]. Essa alteração da microbiota intestinal poderia contribuir para a modificação do perfil metabolômico global desses pacientes, apontado como um dos fatores responsáveis pelo sucesso da cirurgia [25, 46].

Com apoio da Fapesp, o nosso laboratório desenvolve estudo temático com objetivo principal de avaliar se a remissão precoce do DM2 após a DGYR está associada às alterações ômicas que impactam na homeostase glicêmica. O protocolo do referido estudo, denominado SURMetaGIT [47], foi publicado, e suas avaliações metabolômicas fecais constituem foco de análise da presente pesquisa.

2.4 Microbiota intestinal e seus metabólitos

A microbiota intestinal, em eubiose, é composta por trilhões de microrganismos que contribuem com várias funções bioquímicas e metabólicas que o hospedeiro não pode realizar [1]. No entanto, em condições de disbiose, podem acontecer situações adversas à saúde. Entre elas, possivelmente, o ganho de peso corporal. A disbiose intestinal pode gerar desequilíbrio na composição das bactérias que habitam o intestino. Esse desequilíbrio pode ocorrer quando substratos específicos, advindos da dieta, escapam da digestão no estômago e intestino delgado e são metabolizados pela microbiota do cólon, resultando na formação de metabólitos com efeitos prejudiciais à saúde do hospedeiro (Figura 1) [48].



Fonte: Adaptado de Nyangale et al., 2011 [48]

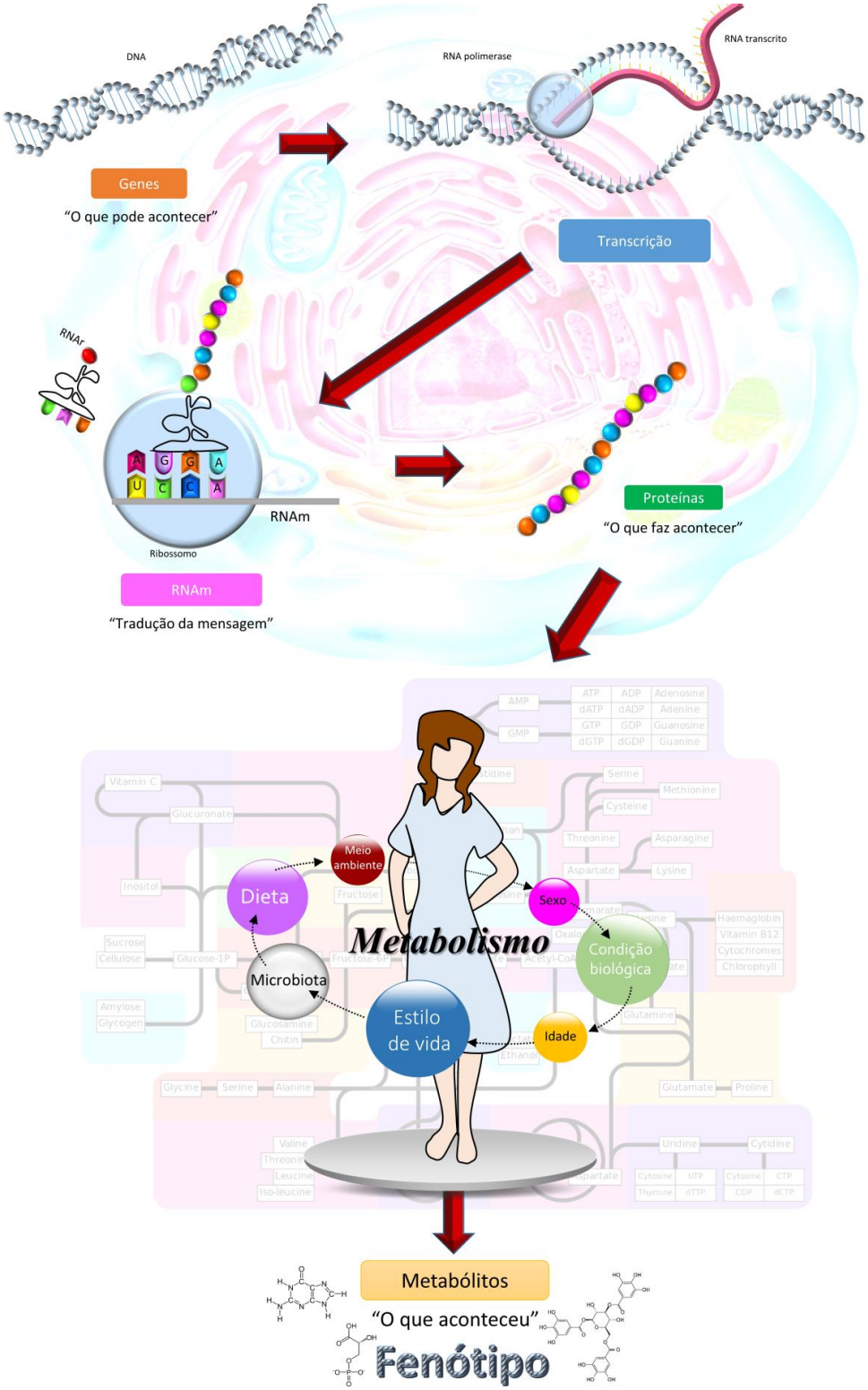
Figura 1 - Metabólitos produzidos pela microbiota no cólon do hospedeiro. Nutrientes que escapam da digestão no trato gastrintestinal (TGI) superior são metabolizados pela microbiota do cólon e podem resultar na formação de metabólitos tóxicos, como sulfeto de hidrogênio (H_2S), amônia (NH_3^+) e dióxido de hidrogênio (H_2)

A microbiota colônica fermenta substratos derivados do hospedeiro, como muco, enzimas pancreáticas e células epiteliais esfoliadas, bem como componentes dietéticos que escapam da digestão no trato gastrintestinal (TGI) superior. Os principais tipos de fermentação microbiana colônica são (a) fermentação sacarolítica de carboidratos e (b) fermentação proteolítica de proteínas [48]. A fermentação colônica microbiana resulta na produção de distintos metabólitos. O tipo e a quantidade dos metabólitos derivados dessa fermentação dependem da composição da microbiota, do tempo de trânsito intestinal e dos substratos disponíveis para a fermentação [49]. Alguns metabólitos são derivados da fermentação de substratos específicos por grupos de bactérias [49]. Metabólitos relacionados à classe de ácidos biliares são originados a partir da transformação e/ou desconjugação pelas bactérias

Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacter, Bacteroides e Clostridium [50]. A homeostase intestinal pode ser modificada por ingredientes alimentares e também por meio de fatores bioquímicos e metabólicos, como pH intracolônico, produção de metabólitos do ácido biliar e produção fermentativa de metabólitos [48].

2.5 Metabólitos

Os metabólitos são compostos de baixa massa molecular (<1.5 KDa) produzidos ou transformados por células, substratos ou produtos finais de processos celulares (Figura 2). Essas moléculas podem desempenhar diferentes funções no metabolismo, que incluem ser combustível para a manutenção de atividades biológicas, sinalização de vias, inibidores ou estimuladores de enzimas, cofatores de enzimas catalíticas e componentes estruturais. O metaboloma pode ser definido como o conjunto de metabólitos em uma matriz biológica. Já a metabolômica compreende o estudo científico do metaboloma e os processos químicos envolvendo os metabólitos. Essa é considerada uma das mais avançadas abordagens de mapeamento químico de um organismo, no qual é possível estudar alterações no metabolismo por meio de análises comparativas entre os perfis obtidos para diferentes amostras biológicas [51].



Fonte: Adaptado de Suhre e Gieger, 2012 [52].

Figura 2 - Figura ilustrativa dos fatores que interferem na produção de metabólitos. A formação dos metabólitos tem origem na informação genética codificada no DNA, que representa "o que pode acontecer" ao longo da vida,

em todas as suas fases de desenvolvimento e envelhecimento. Essa informação é posteriormente transcrita em uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), que transmite os comandos que estão sendo realizados e, portanto, representa “a tradução da mensagem” naquele determinado momento. Durante esse processo, ocorre a formação de elementos-chave do funcionamento biológico e do metabolismo, pois, a partir do RNA, são sintetizadas proteínas. As proteínas são responsáveis por executar os comandos transcritos, ou seja, elas são as substâncias que efetivam as ações necessárias para promover o que foi determinado pelo código genético, a proteína é “o que faz acontecer”. A função biológica das proteínas apresenta uma ampla diversidade; os mensageiros químicos, as enzimas, os transportadores de membrana e vários constituintes estruturais são proteínas. No entanto, as proteínas podem ou não desempenhar suas funções, havendo a possibilidade de permanecerem inativas de acordo com o estado metabólico. Paralelamente, a transformação e a utilização de moléculas químicas provenientes de dieta ou de reservas endógenas dependem da condição biológica. Assim, o metabolismo seleciona e utiliza substratos para a manutenção de suas funções vitais, equilibrando as reações de anabolismo e catabolismo, conforme as necessidades imediatas. Para determinar esse perfil, é necessário identificar os produtos finais desses processos celulares, os metabólitos. Estes regulam a atividade das proteínas, participam dos processos de transcrição e tradução e são as únicas moléculas que não estão sujeitas a modificações pós-traducionais e podem ser utilizadas para compreender “o que aconteceu” [51]. A composição dos metabólitos sofre interferência de fatores ambientais e biológicos, como gênero, idade, estilo de vida, composição da microbiota, dieta e meio ambiente, que refletem o fenótipo do indivíduo [52].

2.6 Metabolômica

A metabolômica é uma ciência ômica emergente que utiliza técnicas analíticas para caracterizar e quantificar pequenas moléculas (metabólitos) em amostras biológicas. Essa ômica monitora flutuações nas concentrações de metabólitos em resposta a vários estímulos e melhora nossa compreensão sobre os processos de doença, mecanismos toxicológicos, descoberta de biomarcadores e variações entre o hospedeiro e sua microbiota intestinal [1].

A análise metabolômica pode ser direcionada à análise de metabólitos que surgem como consequência de interações intergenômicas, ou seja, interações entre o hospedeiro e a sua microbiota intestinal. Esse tipo de

estudo gera informação que pode auxiliar o diagnóstico, a estratificação e o tratamento de doenças com alvo no microambiente intestinal, além de ser importante na elucidação de vias metabólicas relacionadas à obesidade [5, 53-55].

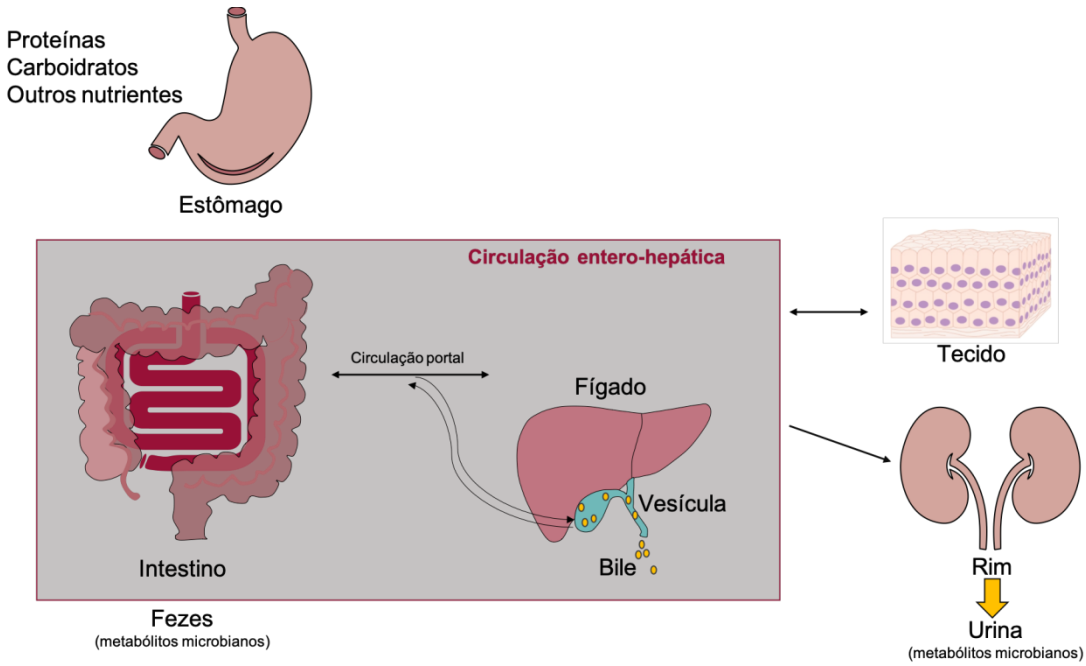
2.6.1 Abordagens de estudo em metabolômica

A análise metabolômica pode ser conduzida de duas formas principais, que podem ser definidas de acordo com os objetivos da investigação. Quando se deseja conhecer o perfil global, é realizada uma varredura para obter o maior número possível de metabólitos, e esse tipo de abordagem é conhecido como *untargeted*, ou seja, sem um alvo específico. Todavia, quando o objetivo da investigação está direcionado a metabólitos específicos, fundamentados em uma hipótese direcionada, a análise é do tipo *targeted*, que significa alvo. Nesse tipo de abordagem, as moléculas de interesse são necessariamente pré-definidas, e pode ser implementada a utilização de padrões internos, que auxiliam a identificação e a quantificação das moléculas de interesse no sistema [51]. As técnicas analíticas para análises metabolômicas estão descritas no Anexo 1.

2.7 Metabolômica fecal

Em humanos, os ingredientes dietéticos ingeridos aportados ao intestino delgado (ID) são absorvidos pela mucosa intestinal e transportados para o fígado por meio da circulação entero-hepática (Figura 3). No fígado, esses ingredientes dietéticos são metabolizados por enzimas do hospedeiro (enzimas da família do citocromo p450), e alguns produtos desse metabolismo são excretados na bile e transportados novamente para o lúmen intestinal, no qual podem ser reabsorvidos pela mucosa intestinal e voltarem para o fígado via circulação portal. No fígado, geralmente, ocorre a conjugação de metabólitos a pequenas moléculas polares, como ácido glucurônico, sulfato,

taurina, glicina ou glutationa. As enzimas (b-glucuronidase, sulfatase e várias glucosidases) produzidas pela microbiota intestinal desempenham papel central na circulação entero-hepática porque são responsáveis pela desconjugação dos componentes acima citados, facilitando sua reabsorção pela mucosa intestinal. Além disso, devido à ausência de algumas enzimas não codificadas pelo genoma humano, polissacarídeos vegetais, incluindo fibra dietética e amido resistente, frequentemente escapam da digestão no estômago e chegam ao cólon [49]. No cólon, esses ingredientes alimentares entram em contato com a microbiota ali residente. Essas bactérias colônicas possuem enzimas que degradam os ingredientes alimentares que não foram absorvidos pelo trato gastrintestinal (TGI) superior, e geram metabólitos que são excretados nas fezes [49, 56].

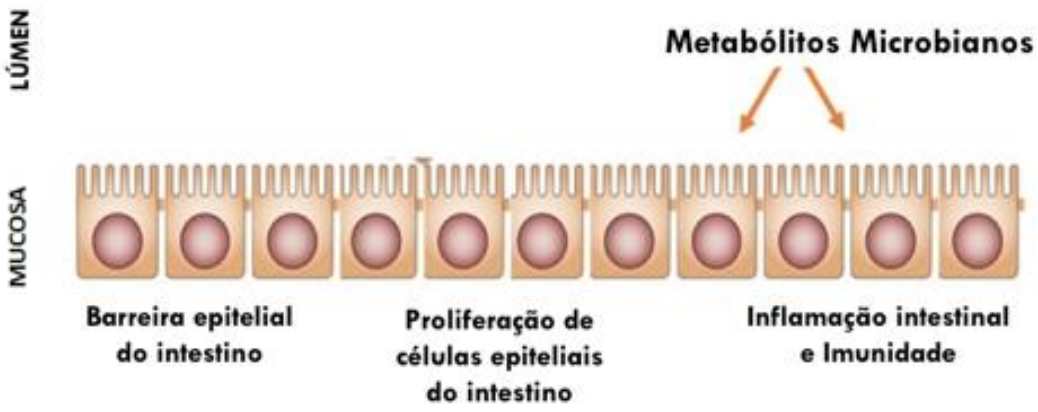


Fonte: Adaptado de Han J et al., 2010 [56]

Figura 3 - Formação de metabólitos microbianos. Ingredientes alimentares são degradados por bactérias colônicas, gerando metabólitos que são excretados nas fezes e urina

Os metabólitos microbianos formados no cólon são influenciados pela quantidade e pelo tipo de componentes dietéticos que sobrevivem à digestão

no intestino delgado. A Figura 4 demonstra o impacto dos metabólitos microbianos no intestino e na função imune. Distúrbios na homeostase entre sinais derivados da bactéria e/ou do hospedeiro podem “alterar” a função de barreira intestinal e levar ao desenvolvimento de desordens imunes na mucosa intestinal [49].



Fonte: Adaptado de Jacobs DM et al., 2009 [49].

Figura 4 - Impacto de metabólitos microbianos no intestino e na função imune. Metabólitos microbianos estão em contato com o lúmen e também com a mucosa intestinal, desempenhando efeito local e sistêmico no hospedeiro. Esses metabólitos participam da função de barreira intestinal, da proliferação de células epiteliais e estão envolvidos no processo de inflamação intestinal e imunidade

Em estudo experimental, Zheng X et al. (2011) identificaram 202 metabólitos urinários e 223 metabólitos fecais envolvidos no cometabolismo entre o hospedeiro e a microbiota intestinal de roedores. Os autores observaram que a microbiota intestinal é capaz de modular o metabolismo sistêmico do hospedeiro ao envolver metabólitos derivados do metabolismo de ácidos biliares, triptofano, lipídeos e aminoácidos [57].

O perfil de biomarcadores “diagnósticos” fecais inclui muitos metabólitos de origem mamífero-microbiana [58]. Esses metabólitos são considerados marcadores importantes para o diagnóstico de indivíduos com risco de diabetes mellitus e doenças intestinais [59].

2.8 Metabolômica fecal após cirurgia bariátrica

A mudança anatômica, associada com a DGYR, faz com que os nutrientes ingeridos sejam desviados e não entrem em contato com grande parte do estômago, duodeno e jejuno proximal. A anastomose da alça biliopancreática com o jejuno permite a drenagem dos AB e secreções pancreáticas, que se misturam aos nutrientes ingeridos no jejuno, região denominada canal comum [60]. A manipulação cirúrgica do trato gastrintestinal promove um impacto profundo no metabolismo, induzindo mudanças importantes em processos de sinalização estimulados por nutrientes e hormônios. Além disso, ocorre mudança na morfologia e função intestinal, pois a presença de nutrientes parcialmente intactos no lúmen estimula o aumento da taxa de proliferação celular, comprimento das vilosidades e profundidade de criptas. Da mesma forma, a ausência de nutrientes causa o efeito oposto. Assim, os segmentos desviados podem se atrofiar pela ausência de nutrientes, e os segmentos que permanecem em contato com o fluxo de nutrientes adaptam-se modificando a arquitetura da mucosa entérica. Os efeitos dos nutrientes no lúmen intestinal parecem ser independentes do peso corporal e de fatores sistêmicos [61]. O que torna de interesse avaliar “o que aconteceu” após essa mudança anatômica e metabólica causada pela DGYR por meio da metabolômica fecal.

Experimentalmente, avaliou-se o perfil de metabólitos microbianos na urina e fezes de ratos Wistar não obesos antes e após a DGYR. Verificou-se nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico o aumento do pH do suco gástrico e a alteração na biodisponibilidade de oxigênio. Os autores também verificaram redução dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e aumento do filo *Proteobactéria*, principalmente da bactéria *Enterobacter hormaechei (E. hormaechei)* em amostras de fezes dos animais submetidos à DGYR [60].

Ao analisar a influência da DGYR na carga citotóxica e genotóxica da amostra fecal, Li et al. (2011b) observaram alto grau de citotoxidade nas

amostras dos animais submetidos à DGYR. Os metabólitos tiramina, metilamina, piruvato, ácido gama aminobutírico (GABA) e putrescina foram diretamente associados com a morte celular. Os autores ressaltam que, apesar do procedimento cirúrgico pela técnica de DGYR ter aumentado a citotoxidade em amostras fecais dos animais, não se pode afirmar que o mesmo acontece em humanos com obesidade grave e diabetes tipo 2, já que humanos possuem mecanismos de detoxificação diferentes dos animais [62].

2.9 Ácidos biliares

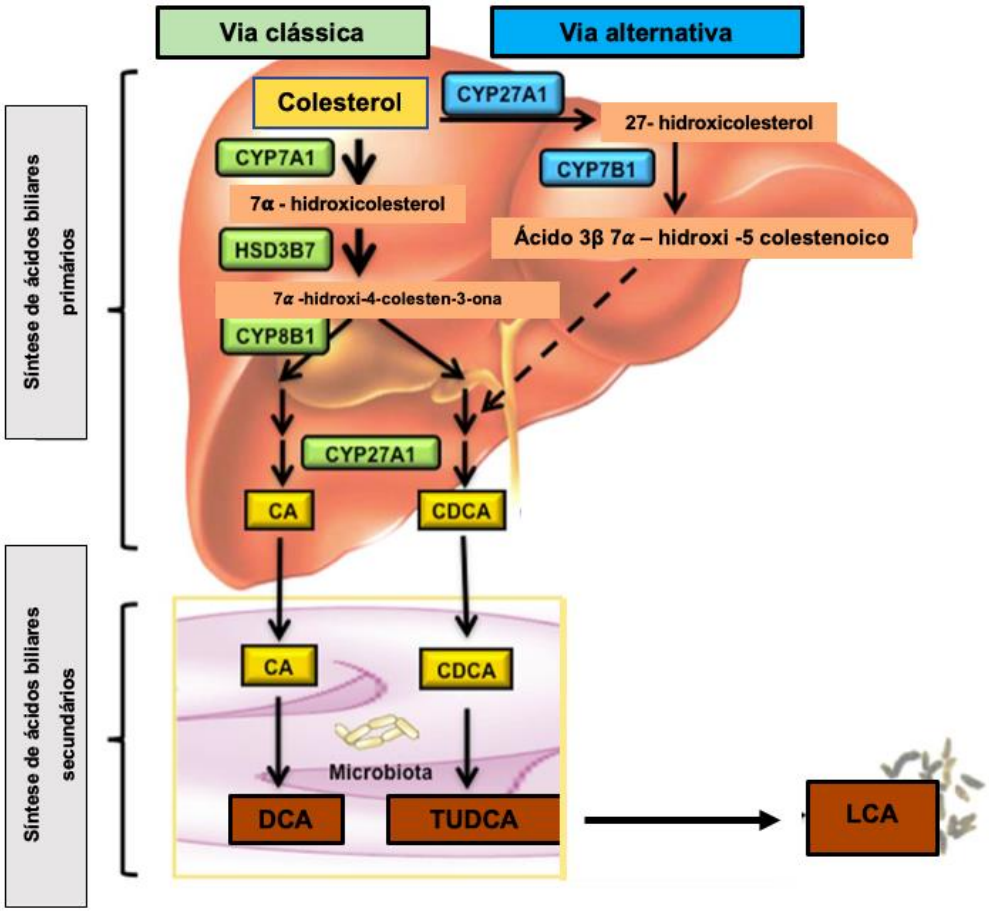
Os ácidos biliares (ABs) são produzidos exclusivamente no fígado, a partir de colesterol [63], e são a principal forma de excreção do colesterol [64]. Eles são moléculas anfipáticas essenciais para solubilização, absorção e metabolismo de lipídeos e vitaminas lipossolúveis. Os principais ABs em humanos são ácido cólico (CA), ácido quenodeoxicólico (CDCA), ácido deoxicólico (DCA) e litocólico (LCA). Os ABs são sintetizados no fígado por uma via que requer a ação de, no mínimo, 14 enzimas hepáticas. Nos hepatócitos, o colesterol sofre uma série de reações de hidroxilação e redução do colesterol, que culminam na síntese de ácidos biliares primários. O ácido cólico apresenta os seus grupos α-hidroxil nas posições 3, 7 e 12, enquanto que o ácido quenodesoxicólico apresenta os seus grupos nas posições 3 e 7 [63]. A enzima 7α hidroxilase de colesterol (CYP7A1) inicia a via clássica para a síntese do ácido biliar, e a enzima 27-hidroxilase de esterol (CYP27A1) inicia a via alternativa [65] (Figura 5).

Via clássica da biossíntese de ácidos biliares

Em humanos, a via clássica é a principal via biossintética dos ácidos biliares, responsável por mais de 90% da produção total de ácidos biliares. Ela inicia pela ação da enzima CYP7A1 ao converter colesterol em 7α-hidroxicolesterol. Em seguida, a enzima desidroxilase 3β-hidroxi-Δ5-C27-esteróide (3β-HSD) converte o 7α-hidroxicolesterol em 7α-hidroxi-4-colesteno-3-ona (C4), que é o precursor comum para ambos ABs primários, CA e CDCA, e tem sido utilizado como um marcador sérico para avaliar a taxa de síntese de ácidos biliares. A proteína esterol microssomal 12α-hidroxilase codificada pelo gene CYP8B1 medeia a hidroxilação de C4 na posição C-12, seguida por várias reações, incluindo a clivagem da cadeia lateral de esteroide pela enzima CYP27A1, levando à síntese de CA. A enzima CYP7A1 regula a taxa global de produção de ácidos biliares, enquanto a CYP8B1 regula a relação entre os dois ácidos biliares primários (CA/ CDCA) [66].

Via alternativa da biossíntese de ácidos biliares

Em humanos, a via alternativa produz menos de 10% do total de ácidos biliares em condições fisiológicas normais. Nessa via, a enzima CYP27A1 mitocondrial catalisa a primeira reação de hidroxilação do colesterol ao 27-hidroxicolesterol e ao ácido 3β-hidroxi-5-colestenóico, que é, subsequentemente, hidroxilado na posição C-7 pela enzima oxiesterol 7α-hidroxilase, codificada pelo gene CYP7B1 para formar 3β, ácido 7a-di-hidroxi-5-colestenóico. O CYP7B1 catalisa várias reações de hidroxilação para a síntese de esteroides em tecidos esteroidogênicos e síntese de oxiesterol em tecidos periféricos. Os intermediários oxisterol formados nos tecidos periféricos podem ser transportados para o fígado e convertidos principalmente em CDCA [66].



Fonte: Adaptado de Li T et al., 2014 [66].

Figura 5 - Vias clássica e alternativa da biossíntese dos ácidos biliares em humanos. A figura mostra as duas vias de síntese de ácidos biliares. A via clássica acontece com a ação da enzima CYP7A1 (localizada no retículo endoplasmático), a qual transforma colesterol em 7α –hidroxicolesterol, que, posteriormente, é transformado em 7α -hidroxi-4-colesten-3-ona por ação da enzima 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B7). A partir dessas reações, é originado o ácido biliar primário CDCA. Já na presença da proteína esterol 12α-hidroxilase, que codifica o gene CYP8B1, ocorre a formação de CA. A via alternativa é iniciada pela enzima esterol 27-hidroxilase mitocondrial (CYP27A1), que catalisa a oxidação da cadeia lateral dos esteroides na síntese de CA e CDCA. Na via alternativa, o colesterol é, primeiramente, convertido em 27-hidroxicolesterol pela enzima CYP27A1. O gene oxisterol 7α-hidroxilase (CYP7B1) catalisa a hidroxilação do 27-hidroxicolesterol para ácido 3β, 7α-dihidroxi-5-colestenóico, que, eventualmente, é convertido em CDCA. O gene CYP7B1 é inespecífico e pode também catalisar a hidroxilação do 25-hidroxicolesterol em 5-colesten-3β, 7α, 25-triol. No intestino grosso, por ação da microbiota, os dois ácidos biliares primários, CA e CDCA, são convertidos em ácidos biliares secundários, DCA e LCA, respectivamente. A enzima CYP3A1 e a epimerase também convertem CDCA em ácidos biliares

secundários, incluindo ácido biliar tauroursodeoxicólico (TUDCA). Nesse processo, grande quantidade de LCA é excretada nas fezes. CYP7A1: enzima 7α hidroxilase de colesterol, HSD3B73: enzima β-hidroxiesteróide desidrogenase, CYP8B1: gene, CA: ácido cólico, DCA: ácido deoxicólico, CYP27A1: enzima esterol 27-hidroxilase mitocondrial, CYP7B1: gene, CYP3A1: gene, CDCA: ácido quenodeoxicólico, TUDCA: ácido tauroursodeoxicólico, LCA: ácido litocólico

2.9.1 Conjugação e desconjugação de ácidos biliares

No fígado, os ABs primários são conjugados com glicina e/ou taurina e originam os ABs primários conjugados: ácido cólico conjugado (taurocólico e glicocólico) e ácido quenodeoxicólico conjugado (tauroquenodeoxicólico e glicoquenodeoxicólico).

Após a conjugação, os ABs são secretados na bile e armazenados na vesícula biliar, onde ocorre a concentração de ABs até a liberação no duodeno [67]. A secreção da bile no lúmen intestinal ocorre por estímulo do hormônio colecistoquinina (CCK) [68,69], e a liberação da bile acontece após a ingestão alimentar [69, 70].

Os ABs conjugados permanecem em forma ionizada em pH intestinal e são chamados de “sais biliares” [63, 69]. Esses sais são detergentes altamente efetivos que promovem solubilização, digestão e absorção de lipídeos dietéticos e vitaminas lipossolúveis no intestino delgado (ID) [69].

2.9.2 Circulação entero-hepática dos ácidos biliares

A absorção de ABs pelos enterócitos é dependente de transporte ativo, principalmente mediado por sódio [71], por meio do transportador de AB ileal (IBAT, também conhecido como ASBT ou SLC1042). Pequena porcentagem de ABs não conjugados pode atravessar, de forma passiva, as membranas do intestino delgado superior e cólon. Após atingir a circulação portal, os ABs retornam aos hepatócitos, são reutilizados e novamente excretados na bile [72, 69, 71]. Aproximadamente 95% dos ABs atuantes nas porções iniciais do

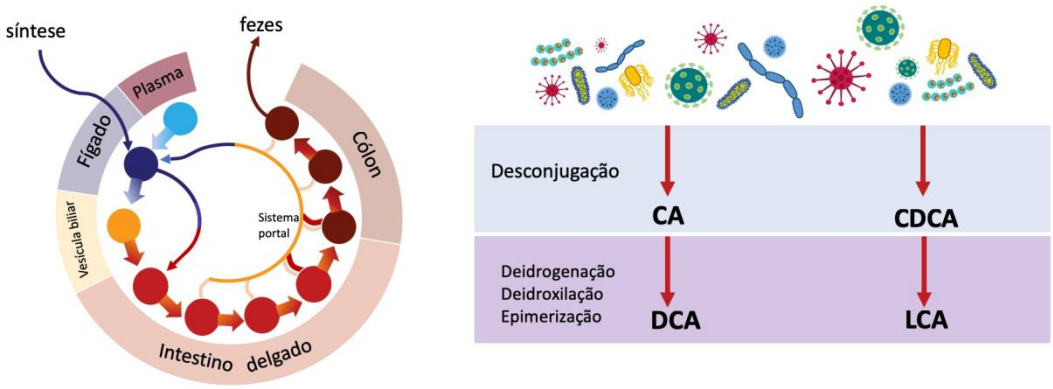
intestino são absorvidos no íleo [69], principal sítio de absorção [63, 67, 69]. Pequena parcela de ABs escapa da absorção intestinal e sofre desidroxilação, reação provocada por enzimas bacterianas, que origina ABs secundários, os quais são absorvidos posteriormente [67]. A circulação entero-hepática resulta na manutenção estável de ABs circulantes. Em geral, todas as perdas que ocorrem pelas fezes podem ser compensadas por maior produção hepática (de 0,3 g a 0,7 g por dia) [71]. A concentração sérica dos ácidos biliares varia conforme o estado de alimentação, podendo estar baixa nos períodos de jejum e mais alta após uma refeição [68, 71.]

2.9.3 Ácidos biliares e microbiota

A pequena parte de ABs primários não absorvida pelo intestino é convertida por ação de enzimas bacterianas intestinais em ABs secundários (LCA e DCA), que são absorvidos pelo intestino [67]. Essas transformações incluem reações de desconjugação, 7α desidroxilação, oxidação e epimerização de grupos 3, 7 e 12 hidroxil, esterificação e desulfatação, descritas no Quadro 1 [69, 72, 73] e ilustradas na Figura 6.

Quadro 1 - Reações enzimáticas que conduzem a transformação de ácidos biliares primários em secundários

Reações enzimáticas	**Descrição**	**Bactérias relacionadas**
Desconjugação	Hidrolases de sais biliares (BHS) realizam a hidrólise (dupla decomposição entre determinado composto e água) sobre a ligação N acil amida e C24 em ABs conjugados.	*Bacteroides fragilis, Bacteroides vulgatus, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes* e muitas espécies de *Lactobacillus e Bifidobacterium*
7α desidroxilação	Devido à inacessibilidade sobre o grupo hidroxil, a desidroxilação ocorre apenas após a desconjugação. A 7α desidroxilação sobre ABs primários (CA e CDCA), que dá origem aos ABs secundários (DCA e LCA), é a conversão mais importante de ABs em humanos.	Membros do filo *Firmicutes (clostridium e Eubacterium)*
Oxidação e epimerização dos grupos 3,7 e 12 hidroxi	Desidrogenases de hidroxiesteroides de ABs (HSDHs) realizam oxidação reversível de hidroxi para grupos oxo	3α e 3β-HSDHs: *Firmicutes* Epimerização 3 hidroxi: *Peptostreptococcus productus, C. perfringens e Eggerthella lenta*. 7α 7β-HSDHs: *Firmicutes* (incluindo espécies do gênero *Clostridium, Eubacterium e Ruminococcus)* 12α ou 12β-HSDHs: *Firmicutes*
Esterificação e desulfatação	Esterficação: reação que resulta na formação de ésteres. Éster de ABs quantifica de10% a 30% do conteúdo de AB total nas fezes de humanos. Desulfatação: converte sulfatos de sais biliares em substratos menos polares e mais eficientemente absorvidos, podendo interferir na excreção fecal de ABs.	*Bacteoides, Eubacterium, Lactobacillus e Firmicutes (Clostridium)*



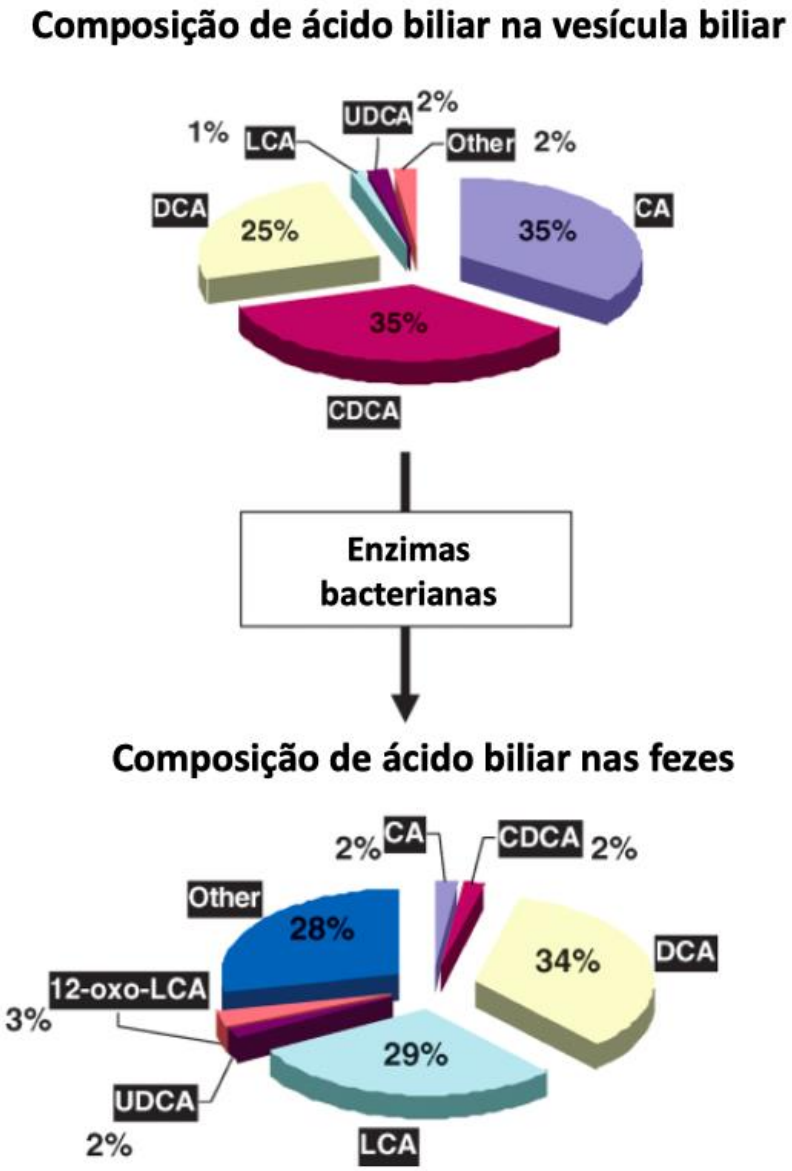
Adaptado de Wahlström A et al. (2016)[74]

Figura 6 - Reações enzimáticas por bactérias intestinais. Bactérias fazem desconjugação de ácidos biliares primários (CA e CDCA) e, por meio de desidrogenação, desidroxilação e epimerização, transformam ABs primários em secundários

Os ABs podem alterar a composição da microbiota intestinal de forma direta por meio de suas propriedades antimicrobianas [69, 74-76] e de forma indireta através de peptídeos antimicrobianos intestinais induzidos por FXR (*Receptor* X *Farnesoide*) ou por meio de regulação da resposta imune do hospedeiro pelos receptores FXR e *Takeda G-protein receptor 5* (TGR5) [72, 77, 78]. A comparação entre a composição de ABs na vesícula biliar e nas fezes de indivíduos saudáveis ilustra a extensão do metabolismo microbiano sobre o conteúdo de ABs no intestino grosso (Figura 7) [79-81]. A potência do AB secundário DCA como agente antimicrobiano é maior do que o poder do AB primário CA, devido à sua hidrofobicidade e às propriedades detergentes sobre a membrana bacteriana [65, 72]. Mudanças complexas e significativas na composição da microbiota intestinal são observadas em ratos alimentados com dieta rica em CA, com aumento do filo *Firmicutes* de 54% para 93% a 98% do microbioma. A classe *Clostridia* também aumentou de 8,3% para 55% a 62% [72, 82].

A redução de ABs no intestino pode favorecer o crescimento de bactérias gram-negativas, com produção de potentes lipopolissacarídeos e

potenciais patógenos. De forma distinta, o aumento em níveis de ABs no intestino pode favorecer o crescimento de bactérias gram-positivas do filo *Firmicutes*, incluindo bactérias que realizam 7α desidroxilação de ABs primários do hospedeiro em ABs secundários tóxicos [72]. A “comunicação” entre as bactérias e os ABs no intestino pode impactar a saúde de forma global e influenciar o *pool* sistêmico, bem como a homeostase intestinal da microbiota. Nesse cenário, espera-se que o perfil de AB fecal possa refletir as condições de saúde ou doença [83].



Fonte: Adaptado de Ridlon et al. (2006)[69]

Figura 7 - Composição de AB na vesícula biliar e fezes. Após a ação de enzimas bacterianas intestinais, observa-se redução drástica no percentual dos ácidos biliares primários, CA e CDCA, dando origem a ácidos biliares secundários, os quais aumentaram sua quantidade percentual nas fezes (LCA e DCA). "Outros" ABs referem-se a derivados oxo e 3β-hidroxi de ABs secundários. CDCA: ácido quenodeoxicólico, DCA: ácido deoxicólico, LCA: ácido litocólico, UDCA: ácido ursodeoxicólico, 12-oxo-LCA: ácido 12-oxo-litocólico.

As relações entre microbiota, ácidos biliares e obesidade foram exploradas por Ridaura et al. (2013). Os autores avaliaram a composição da microbiota intestinal e de 37 espécies de ABs em amostra cecal de camundongos gêmeos obesos e gêmeos magros, e observaram redução significativa nos níveis de 8 ABs em obesos comparados com os magros. Ao realizarem transplante de microbiota de camundongos magros para obesos, verificaram mudança no perfil de ABs nos camundongos obesos, que se assemelhou ao dos magros. Os autores destacam que o novo metabolismo de ABs pós-transplante fecal nos animais obesos poderia contribuir para o melhor controle do peso e do fenótipo metabólico, com efeitos mediados pela microbiota intestinal. Foram observados níveis aumentados de FXR e Fgf-15 no íleo e redução na expressão hepática de CYP7A1 em camundongos obesos comparados com magros [84], sugerindo que ABs específicos agem como mediadores moleculares produzidos pelo microbioma [72].

2.9.4 Ácidos biliares e ativação de receptores

ABs têm sido considerados importantes para tratar doenças metabólicas como obesidade, DM2, hiperlipidemia e aterosclerose pelo seu impacto sobre diversas vias de sinalização celular [72, 85].

2.9.4.1 Receptor X *Farnesoide*

FXR é o principal sensor biológico de ABs no fígado e intestino [72, 86, 87] mas também é expresso no tecido adiposo branco [88], coração [89], pâncreas e rim [90]. Esse receptor nuclear pode ser ativado por ABs primários e secundários. O CDCA é o seu agonista mais potente em sua forma conjugada e desconjugada [84, 91-96].

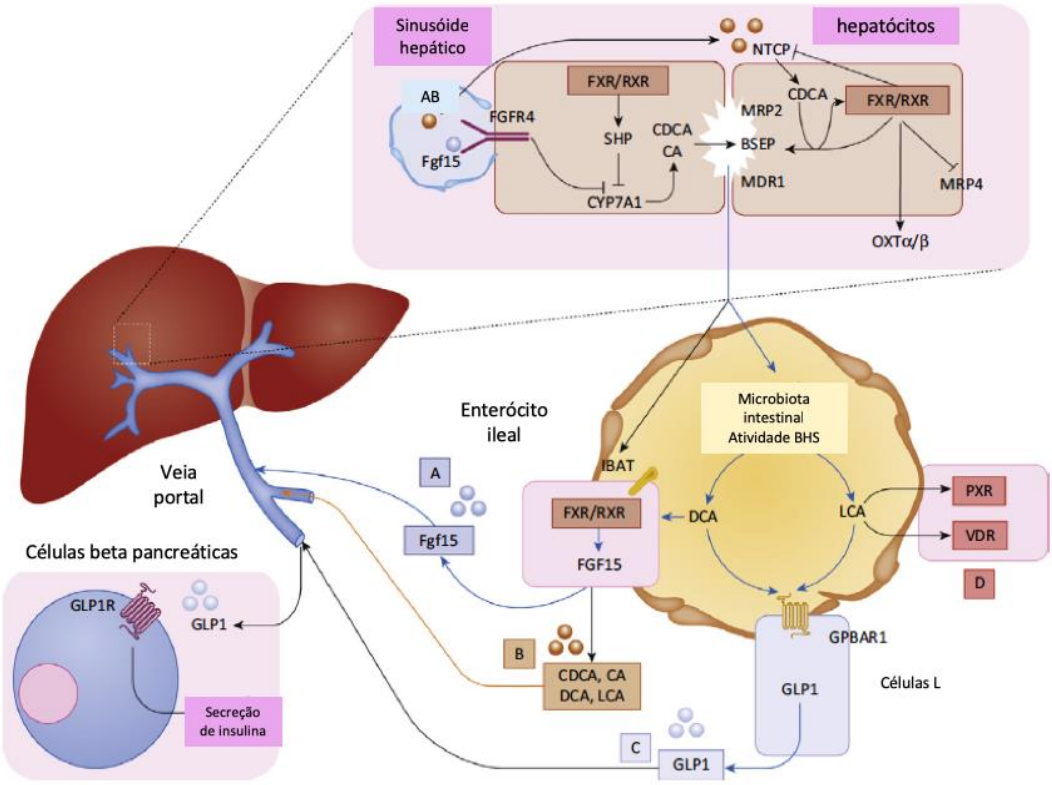
Do ponto de vista metabólico, a ativação de FXR promove uma cascata de vias de sinalização e modula o metabolismo de lipídios e a homeostase glicêmica e energética. A relação de FXR e homeostase glicêmica foi

estabelecida ao se considerar que: DM2 se associa com hipertrigliceridemia, FXR controla o metabolismo de triglicerídeos e o perfil de ABs é diferente em pacientes diabéticos do que controles [97].

A inter-relação de ABs com FXR impacta a homeostase glicêmica por mecanismos distintos. ABs modulam a gliconeogênese ao regular a expressão de enzimas dessa via anabólica, mais especificamente PEPCK (do inglês, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*), G6Pase (do inglês, glucose-6-phosphatase) e FBP1 (do inglês, *fructose-1,6-biphosphatase*) [98, 99].

Pacientes com DM2 descompensado apresentam aumento da produção e excreção fecal de ABs, normalizada após tratamento com insulina [106]. A ativação de FXR hepático também se associa com a melhora do perfil lipídico ao diminuir níveis de triglicerídeos, favorecer *clearance* de VLDL e quilomícrons, bem como aumentar a beta oxidação [100].

A Figura 8 mostra a circulação entero-hepática de ABs envolvendo atividade BHS da microbiota intestinal, bem como ligantes e hormônios envolvidos.



LCA: ácido litocólico, MRP4: membro C da família 4 transportador ABC, NTCP: carregador de soluto família 10, (cotransportador AB/sódio), membro 1, PXR: receptor X pregnano, OST: transportador de soluto orgânico, SHP: pequeno parceiro heterodimérico, VDR: receptor de vitamina D, MRP2: proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 2, MDR1: transportadores dependentes de ATP - cations orgânicos hidrofóbicos, IBAT: transportador de ácido biliar ileal, BSEP: bomba de exportação de sal biliar.

Fonte: Adaptado de Fioriccis et al., 2015 [72].

Figura 8 - Circulação entero-hepática e metabolismo do AB intestinal por hidrolases de sais biliares (BHS) expressando receptores ativados por ABs de bactérias intestinais no intestino, fígado e órgãos endócrinos. Circulação entero-hepática e metabolismo do AB intestinal por hidrolases bacterianas de sais biliares (BHS) com expressão de receptores ativados por AB no intestino, fígado e órgãos endócrinos (A-D). São esquematizados os principais eixos metabólicos gerados pelo metabolismo bacteriano intestinal de AB. (A). **Eixo FXR-Fgf15**. Ativação de FXR nos enterócitos ileais libera Fgf15 (FGF19 é a forma em humanos), o qual alcança os hepatócitos por meio da circulação portal, liga-se ao receptor do fator de crescimento fibroblasto 4 (FGFR4) e inibe a enzima CYP7A1, bloqueando a síntese de AB pelo hepatócito de maneira dependente de FXR, pela ativação do parceiro heterodimérico (SHP). Ligantes de FXR regulam negativamente a captação de AB basolateral pelos hepatócitos via repressão de NTCP, o qual estimula a expressão de genes sobre MRP3, BSEP, MRP4 e OSTα/β. (B) **Ativação de BARS**. ABs provenientes da circulação entero-hepática exercem efeitos sistêmicos por

ativar vários BARS em diferentes tecidos. Os ABs CA e CDCA são ligantes para FXR, enquanto DCA e LCA são ligantes preferenciais para GPBAR1. (C) **Eixo GPBAR1 – GLP1**. Ativação de GPBAR1 (TGR5) em células endócrinas ileal (células L) desencadeia liberação de GLP1 que chega ao fígado por meio da circulação portal e, posteriormente, ao pâncreas, onde ocorre a indução da secreção de insulina pelas células beta. (D) **eixo metabólico e xenobiótico (detoxificação) ativado por LCA.** LCA é um ligante para PXR e VDR. Ativação de VDR. Ativação de VDR e PXR por LCA ocorre em muitos tecidos além dos enterócitos intestinais. AB: ácido biliar, BHS: hidrolases de sais biliares, CA: ácido cólico, CDCA: ácido quenodeoxicólico, CYP7A1: citocromo p450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1, DCA: ácido deoxicólico, FGF4R: receptor do fator de crescimento fibroblasto 4, Fgf15: fator de crescimento do fibroblasto 15, FXR: receptor X do farsenoide, GLP1: peptídeo 1 ligado ao glucagon, GLP1R: receptor de peptídeo 1 ligado ao glucagon

2.9.4.2 Receptor 5 da proteína-G de Takeda (TGR5-*Takeda G-protein receptor 5)*

O TGR5 é um receptor de membrana expresso em algumas células como os macrófagos e neutrófilos na vesícula biliar, tecido adiposo marrom e branco, músculo esquelético, cérebro e pâncreas. Esse receptor é ativado por concentrações nanomolares de LCA e TLCA e por concentrações micromolares de CA, DCA e CDCA [101-104]. Através da ligação ao TGR5, os ABs podem exercer funções anti-inflamatórias e de imunossupressão, energia e homeostase glicêmica.

No contexto metabólico, TGR5 pode ser um alvo promissor para o tratamento de doenças associadas ao ganho de peso. Isso porque a atividade desse receptor já foi apontada como estimulante da fosforilação oxidativa mitocondrial, o que aumenta o gasto energético. Adicionalmente, TGR5 pode estimular a produção de GLP-1 (do inglês, *glucagon-like peptide*) em células enteroendócrinas no intestino, favorecendo a regulação da homeostase glicêmica [66]. Em estudo experimental, observou-se que a administração de agonistas de TGR5 aumentou a razão intracelular de ATP/ADP e o influxo de cálcio, que promoveu aumento da secreção de GLP-1 [105].

2.9.4.3 Ação conjunta de FXR e TGR5

Nas células β pancreáticas, a secreção de insulina ocorre pela ação conjunta de FXR e TGR5, dependente do aumento da concentração de cálcio [106,107]. Experimentalmente, células α pancreáticas também expressam TGR5, o que nos permite considerar que a ativação de TGR5 por ABs modifica o fenótipo secretor de células α de glucagon para GLP-1 e, assim, promove efeito parácrino sobre as células β para estimular a secreção de insulina [108]. Dessa maneira, considera-se que a ação conjunta de FXR e TGR5 poderia influenciar a atividade de células em diferentes locais do corpo e, assim, desempenhar papel fundamental na regulação do metabolismo global e da glicose [109].

Pesquisas têm demonstrado que a ativação intestinal de FXR causou hiperglicemia, e o estímulo na sinalização de TGR5 melhorou o nível glicêmico e a homeostase energética [109]. Já foi visto que a ativação de TGR5 associada ao bloqueio intestinal de FXR por ABs foi apontada como possível abordagem para o controle da glicemia em pacientes com DM2 [109,110].

2.9.5 Ácidos biliares e alterações metabólicas após DGYR

Em condição saudável e fisiológica, a potência da ligação de ABs com seus receptores pode sofrer influência da sua diluição, associação com micelas e nutrientes na luz intestinal [112]. A partir da mudança anatômica ocasionada pela DGYR, os nutrientes ingeridos são desviados e não entram em contato com grande parte do estômago, duodeno e jejuno proximal. A anastomose da alça biliopancreática com o jejuno, canal comum, permite a drenagem de ABs e secreções pancreáticas, que se misturam aos nutrientes ingeridos no jejuno [24]. A DGYR promove aumento do fluxo entero-hepático, elevando a absorção de AB no íleo [36]. O progresso da bile na alça biliopancreática passa a ocorrer em um estado não diluído, no qual há maior disponibilidade de AB para ligação em receptores específicos. Assim, os ABs podem desempenhar ações importantes na modulação do metabolismo após

a DGYR, por serem moléculas centrais na sinalização de diversos processos relacionados à utilização de substratos energéticos [112]. Nesse sentido, a melhora da homeostase glicêmica poderia resultar no aumento dos níveis plasmáticos de AB e na diminuição de sua excreção nas fezes, uma condição frequentemente observada após a DGYR [113, 114].

Os mecanismos potencialmente envolvidos na melhora metabólica após a DGYR incluem restrição calórica e rápida chegada de nutrientes no intestino distal, alteração na circulação entero-hepática de ABs e perda de peso [115]. De fato, dados recentes em modelos experimentais e em humanos [113,114, 116-119], indicam que procedimentos cirúrgicos antiobesidade, que buscam remissão do diabetes tipo 2, têm participação de ABs aumentados no plasma [46, 119]. Além disso, mudanças significativas na composição e riqueza da microbiota intestinal também são observadas após procedimentos bariátricos [18, 120-122] e podem contribuir para mudanças no *pool* de AB. A DGYR remodela a microbiota, podendo afetar o padrão de secreção dos hormônios GLP1 e GLP2 , que é liberado por células endócrinas no íleo por ABs secundários [72].

No que se refere ao perfil de metabólitos de ABs em amostras fecais após a DGYR, poucos estudos foram conduzidos até o momento, e a maioria é de caráter experimental. Especificamente em modelos animais, estudos apontaram redução de ABs fecais após a DGYR [69, 74, 75]. Entretanto, nenhum estudo até o momento correlacionou o perfil de ABs fecais após a DGYR com a remissão do DM2 pós-operatória [25].

3 Hipótese e Justificativa do Estudo

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

3.1 Hipótese

Nossa hipótese considera que a DGYR altera o perfil de metabólitos e de ABs fecais de mulheres obesas portadoras de DM2 e que isso pode estar relacionado com a melhora do DM2 pós-operatório.

3.2 Justificativa do estudo

Em pacientes com diabetes tipo 2, após DGYR, ocorre rápida recuperação da homeostase glicêmica antes mesmo de perda de peso significativa. No entanto, a remissão pós-operatória de DM2 não é universal, e algumas pacientes persistem com a doença, por motivos ainda não esclarecidos.

É de interesse compreender os mecanismos da DGYR associados aos seus benefícios metabólicos, em particular sobre a DM2. Essa informação poderá futuramente evoluir para proposição de novos tratamentos menos invasivos para a doença. Entre as diferentes abordagens possíveis, encontra-se a análise metabolômica fecal, que explora as interações metabólicas entre hospedeiro, dieta e microbiota intestinal. Trata-se de técnica não invasiva que permite comparar o perfil metabolômico fecal antes e após a DGYR. Esse conhecimento poderá identificar novos biomarcadores relacionados com a melhora da obesidade e do DM2 após DGYR.

Nessa perspectiva, a caracterização de metabólitos por meio da metabolômica fecal, em especial o perfil de ácidos biliares fecais, poderá melhorar nossa compreensão a respeito da remissão do DM2 após DGYR. Eventualmente, nossos achados poderão oferecer subsídios para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas à prevenção e ao tratamento dessas doenças.

4 Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Identificar alterações no perfil de metabólitos fecais de mulheres obesas com diabetes tipo 2, após a Derivação Gástrica em Y de Roux, por meio de diferentes técnicas metabolômicas.

4.2 Específicos

- Identificar alterações no perfil de metabólitos fecais 3 e 12 meses após DGYR em relação ao período pré-operatório por meio de análise metabolômica *untargeted;*

- Identificar alterações no perfil de metabólitos fecais 3 e 12 meses após DGYR por meio de análise metabolômica *targeted*;

- Avaliar o perfil de ácidos biliares fecais 3 e 12 meses após DGYR e sua relação com a remissão de diabetes tipo 2.

5 Métodos

5 MÉTODOS

5.1 Local de execução do trabalho

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM/35) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em parceria com a Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica da mesma instituição.

5.2 Aspectos éticos

A presente investigação foi submetida à aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq), em 23/02/2011 (Anexo 2), sob o número 1011/09 e registrada na Plataforma Brasil (19339913.0.0000.0068) e www.clinicalTrials.gov (NCT01251016). A presente tese de doutorado faz parte de um Projeto Temático e foi desmembrada pela CAPPesq (Anexo 3).

5.3 Seleção de pacientes

Foram selecionadas 20 mulheres adultas (de 18 a 60 anos), com obesidade grave e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), candidatas à cirurgia bariátrica pela técnica de Derivação Gástrica em Y de Roux (sem anel) na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP). Os critérios de inclusão foram: mulheres adultas (de 18 a 60 anos), Índice de Massa Corporal (IMC) entre 35 kg/m^2 e 50 kg/m^2, diagnóstico comprovado de

DM2 (glicemia de jejum - GJ >126 mg/dl e hemoglobina glicada - HbA1c > 6,5%) e/ou uso de antidiabético oral. Os critérios de exclusão foram: uso de qualquer tipo de insulina, presença da bactéria *Helicobacter Pylori* no estômago, diagnóstico de doenças da tireoide: hormônio tireoestimulante (TSH) < 0,27 ou > 4.2μIU/mL, triidotironina (T3), 80 ou ≥ 200ng/dL, tiroxina (T4) < 5,1 ou > 14,1μg/dL e presença de disfunção hepática grave: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamiltransferase (Gama-GT) com valores superiores a três vezes o valor de referência pela Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP, conforme descrito a seguir – ALT e AST > 93 U/L e Gama - G> 108 U/L, participação atual ou recente em outro protocolo de estudo intervencionista e recusa em participar do estudo e/ou em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.4 Obtenção de consentimento informado

O protocolo de estudo foi explicado detalhadamente, bem como todos os procedimentos envolvidos, para a paciente e seu representante legal. Após a aceitação da paciente em participar da pesquisa, o TCLE foi assinado pela paciente e/ou representante legal (Anexo 4).

5.5 Desenho do protocolo de estudo

As atividades previstas no protocolo do presente estudo foram desenvolvidas ao longo de aproximadamente 15 meses para cada paciente. As consultas aconteceram desde a triagem até o período pós-operatório de 12 meses, conforme ilustrado na Figura 9.

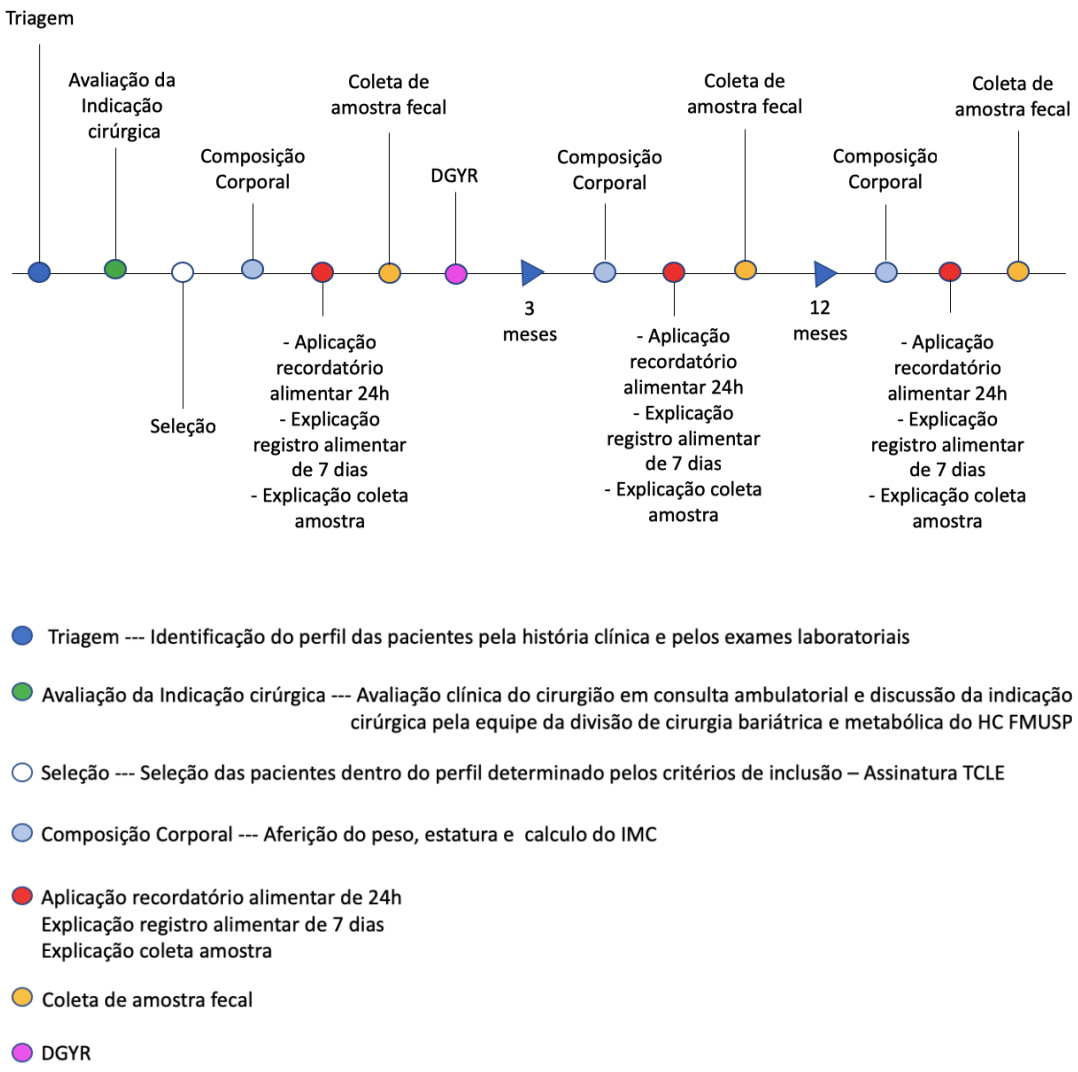


Figura 9 - Desenho do protocolo de estudo, com descrição dos procedimentos gerais de exames e coleta de amostras

5.5.1 Composição corporal

Para caracterização da amostra e sua resposta à DGYR, foram coletados dados de idade, tempo de obesidade e de DM2 (< 5 anos de DM2 e > 5 anos de DM2) e medidas antropométricas. As medidas antropométricas do presente estudo foram aferidas no pré-operatório (T0) e pós-operatório de 3 (T1) e 12 meses (T2) de cirurgia para acompanhar a evolução da paciente após a realização da intervenção cirúrgica.

O peso atual (kg) foi mensurado em balança eletrônica para obesos (carga máxima 500 kg e divisão 100 gramas; Lucastec®, Brasil), com a paciente vestindo apenas roupas leves. A altura foi medida com auxílio de estadiômetro (Sanny®, **American Medical do Brasil),** com a paciente em pé, com os pés descalços, calcanhares unidos, costas eretas e os braços estendidos ao lado do corpo. O IMC foi calculado usando a fórmula peso/altura [2, 123].

As medidas de circunferências foram realizadas com fita métrica inelástica com escalas em centímetros. A medida da circunferência do braço foi realizada sobre o ponto médio entre a distância da projeção lateral do acrômio e a margem inferior do olecrano. Para achar o ponto médio, a paciente foi orientada a ficar com o antebraço na posição de ângulo de 90° e a mão voltada para cima. Para a medida da circunferência da cintura, devido à dificuldade de achar o ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela, foi utilizado o ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca (próxima à região umbilical). A circunferência do quadril foi medida no seu maior diâmetro [124].

5.5.2 Exames bioquímicos

Foram medidas as concentrações de glicose, insulina, peptídeo C e perfil lipídico (colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides) em amostras de plasma ou soro colhidas algumas semanas antes da DGYR (pré-operatório) e nos períodos pós-operatório de 3 e 12 meses. A hemoglobina glicada (HbA1c) também foi mensurada nos tempos acima referidos.

Todas as amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum. O teste de alimentação foi realizado, e novas coletas foram feitas, após 30, 60, 90 e 120 minutos da ingestão oral de 200 ml de dieta normocalórica, normolipídica e normoproteica (*EnsureTM*, Abbott, EUA) para análise de glicose e insulina.

Os exames bioquímicos (glicose, HbA1c, insulina, peptídeo C e perfil lipídico) foram analisados na Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP por método enzimático (glicose e perfil lipídico), cromatografia líquida (HbA1c) e eletroquimioluminescência (insulina e peptídeo-C).

5.5.3 Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia foram classificadas de acordo com os critérios da Federação Internacional de Diabetes (IFD)[125,126], os quais incluem altos níveis de triglicérides, baixos níveis de colesterol HDL e glicemia de jejum aumentada (Quadro 2).

Quadro 2 - Definição de Síndrome Metabólica de acordo com *International Diabetes Federation* (IDF) [126]

Critérios para Síndrome Metabólica incluem: Obesidade abdominal (definida pela circunferência abdominal, valores de acordo com a etnia) ± dois dos seguintes fatores:	
Aumento de triglicerídeos	>150 mg/dL (1.7 mmol/L) ou tratamento específico para hipertriglicidemia
HDL colesterol reduzido	< 40mg/dL (1.03 mmol/L) em homens; < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) em mulheres ou tratamento específico para essa anormalidade
Pressão arterial aumentada	sistólica BP ≥ 130 mm/Hg ou diastólica BP ≥ 85 mm/Hg ou tratamento para hipertensão arterial
Glicemia de jejum aumentada	≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) ou diagnóstico prévio de diabetes mellitus tipo 2

Fonte: Adaptado de *International Diabetes Federation (IDF)* [126]

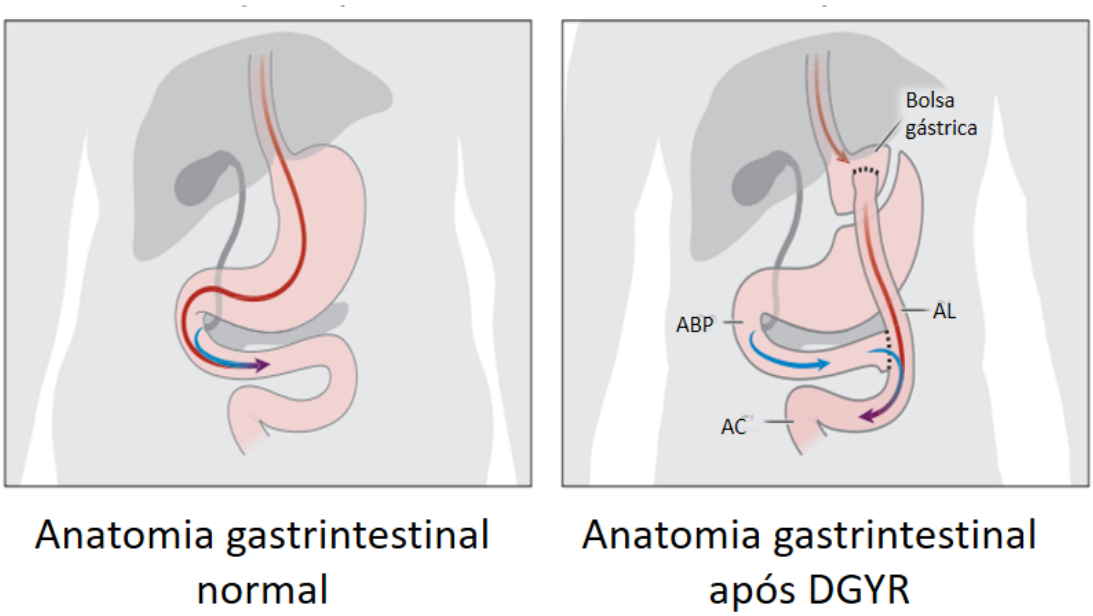
5.5.4 Avaliação quantitativa e qualitativa da ingestão alimentar

Dois inquéritos alimentares foram aplicados para análises quantitativas da ingestão de alimentos: registro alimentar de 7 dias (R7d) e recordatório alimentar de 24 horas (R24h) (Anexo 5 e 6). O R7d foi aplicado como método de referência, e todos os resultados da ingestão foram baseados nele. O R24h

foi aplicado para avaliar sua eventual concordância com R7d, através da comparação de dados e informações obtidas por ambas as ferramentas. Para aplicação do R7d, a paciente recebeu e foi ensinada a usar o livro Consumo Alimentar – Visualizando Porções [127], que levou para casa. Tomando-o como referência, anotou no registro alimentar o número da foto correspondente ao tamanho da porção ingerida. Durante a semana de registro, a paciente recebeu uma ligação telefônica para lembrar da tarefa e tirar possíveis dúvidas. Para aplicação do R24h, a quantidade de alimentos consumida foi anotada em termos de unidades, medidas caseiras ou através de fotos, através de entrevista presencial. O software Virtual Nutri Plus® (VNP) [128] foi utilizado para calcular as calorias totais, macro e micronutrientes ingeridos, a partir dos dados obtidos por R7d e R24h. As seguintes fontes de dados foram utilizadas para determinar a composição nutricional das refeições ingeridas: Tabela de Composição Química de Alimentos, desenvolvida por Sonia Tucunduva Philippi [129], e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) [130]. Para avaliação qualitativa da ingestão alimentar, aplicou-se o QFA (Anexo 7).

5.5.5 Derivação gástrica em Y de Roux

Todas as pacientes foram submetidas à DGYR sem anel, por meio de laparotomia, realizada na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP). A DGYR reduz o estômago ao realizar uma bolsa gástrica proximal, com aproximadamente 30 mL de capacidade total, e exclui o restante do estômago, duodeno e parte do jejuno proximal do fluxo de nutrientes (Figura 10).



Legenda - AL, alça alimentar; ABP, alça biliopancreática; AC, alça comum

Figura 10 - Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR: anatomia gastrintestinal normal e alterada após DGYR

A reconstrução do trânsito alimentar ocorre pela prática de anastomose gastrojejunal término-lateral entre a bolsa gástrica e o jejuno. Pratica-se a secção do jejuno proximal ou médio, medido a partir de 50 cm a 100 cm do ângulo de Treitz. A porção distal do jejuno é levada ao novo reservatório gástrico (anastomose gastrojejunal), e o trânsito alimentar passa a ser restaurado pela alça alimentar. A outra porção proximal que se encontra exclusa do trânsito alimentar (estômago, duodeno e jejuno proximal) é anastomosada na alça jejunal que originou a anastomose gastrojejunal, em uma região aproximadamente a 120 cm abaixo desta, e, com isso, restaura-se o trânsito biliodigestivo, formando-se a alça biliopancreática. Essa enteroanastomose (Y de Roux) marca o ponto de convergência entre as duas alças intestinais, em que o alimento que vem pela alça intestinal alimentar encontra-se com as secreções biliodigestivas que vêm da alça biliopancreática. A partir dessa junção, denominada alça intestinal comum, há maior absorção de nutrientes no restante do intestino distal.

Para o presente estudo, os tamanhos das alças biliopancreática e de alimentação foram padronizados em 50-60 cm e 100-120 cm, respectivamente.

5.6 Análise estatística dos dados clínicos e bioquímicos

As análises estatísticas de dados clínicos, do consumo alimentar e de parâmetros bioquímicos foram feitas por testes não paramétricos (*Mann-Whitney*) e paramétricos (ANOVA, Teste t), com uso do software R na versão 3.3.0 (www.r-project.org), considerando-se o nível de significância de 5%. Variáveis contínuas foram sintetizadas em mediana (mínimo-máximo) quando a distribuição foi assimétrica. As medidas descritivas mediana, mínimo, máximo e amplitude quartil (IQ) foram consideradas para resumir as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram expressas por meio das frequências absolutas e relativas (%).

Para variáveis contínuas, a diferença entre os grupos foi testada com o uso do teste *Mann-Whitney* (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias). O teste exato de *Fisher* foi utilizado para avaliar a associação entre grupos (responsivos e não responsivos à remissão do DM2) e as variáveis qualitativas [131]. A comparação dos grupos em relação à idade e a comparação transversal dos grupos em relação às variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste de *Mann-Whitney* [132].

5.7 Protocolo de estudo

O estudo de metabolômica fecal foi realizado em três etapas, descritas a seguir: (1) Em primeiro lugar, realizamos estudo-piloto com 10 pacientes inseridas no estudo, utilizando abordagem de metabolômica *untargeted* para verificar existência de distinção entre o perfil metabólico das pacientes nos períodos pré e pós-operatório (3 e 12 meses); (2) Posteriormente, conduzimos

análise metabolômica *targeted,* com intuito de verificar alterações nos níveis de ácidos biliares; (3) Separamos o grupo de pacientes em responsivas (R) e não responsivas (NR) e verificamos quais ácidos biliares quantificados pela metabolômica *target* estiveram correlacionados com a remissão do DM2 pós-operatória.

5.7.1 Protocolo da coleta das amostras de fezes até a extração

O protocolo que envolveu a aquisição das amostras fecais até a extração dos metabólitos envolveu 5 passos, ilustrados na Figura 11 e descritos a seguir.

Siglas: DGYR: Derivação Gástrica em Y de Roux; LIM 35: Laboratório de Investigação Médica

Figura 11 - Protocolo de coleta das amostras fecais

5.7.2 Consulta para explicação da coleta de fezes

Inicialmente, foi aplicado às pacientes o recordatório alimentar de 24 horas (Anexo 4) e, em seguida, as pacientes foram orientadas quanto ao preenchimento do registro alimentar de 7 dias (Anexo 5), antes e após a DGYR. Um coletor de *Fisher* (*Commode Specimen*; *Fisher Scientific*, Ottawa, ON, Canadá) para a coleta de fezes foi fornecido às pacientes, que foram instruídas a realizar a coleta da amostra fecal no dia seguinte após a conclusão dos registros alimentares.

5.7.3 Coleta de amostras de fezes

As amostras de fezes foram coletadas com o auxílio do coletor de *Fisher* e estocadas a -20ºC na residência da paciente por um período de 4 horas.

5.7.4 Transporte das amostras da residência da paciente até o laboratório

Após o período de 4 horas da coleta das amostras de fezes, o coletor de *Fisher* contendo o material biológico congelado foi transportado da residência da paciente até o laboratório de investigação médica 35 (LIM/35) em contêiner com gelo em temperatura controlada a -4ºC pela empresa *World Courier* (São Paulo, Brasil).

5.7.5 Recebimento e processamento das amostras no LIM/35

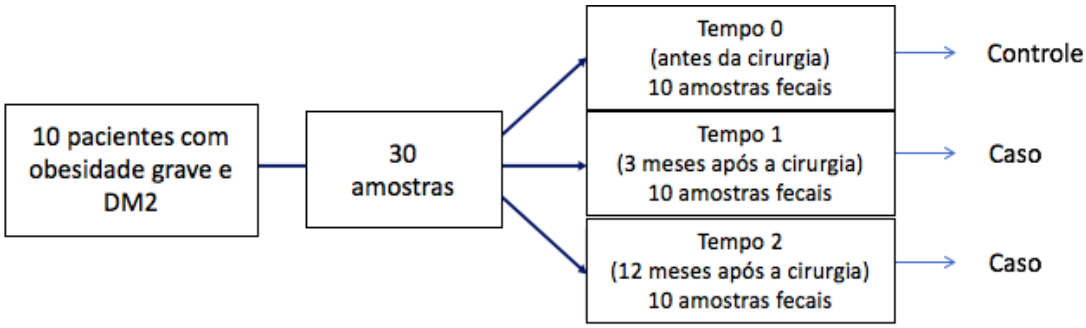
No LIM/35, as amostras de fezes foram recebidas pelo pesquisador responsável, homogeneizadas, pesadas (1 g) e aliquotadas em 10 tubos criogênicos de 2 mL (Kasvi, Canadá).

5.7.6 Estocagem das amostras até a extração dos metabólitos

Os tubos criogênicos foram identificados com o nome da paciente, período da coleta (pré-operatório, pós-operatório de 3 meses e pós-operatório de 12 meses) e data e, em seguida, foram colocados em caixas, que foram armazenadas em freezer a -80ºC (Thermo TLE 600 Freezer) até a extração dos metabólitos.

5.8 Análise metabolômica *untargeted*

Com o intuito de verificar se houve diferenciação entre o perfil de metabólitos em água fecal antes e após DGYR, conduzimos estudo-piloto no qual analisamos amostras de 10 pacientes. As análises metabolômicas do tipo *untargeted* com amostras fecais foram processadas em três momentos distintos (pré-operatório e pós-operatórios de 3 e 12 meses), como mostrado na Figura 12.



Legenda - Dez amostras foram coletadas antes da cirurgia para o estudo-piloto, as mesmas 10 amostras foram coletadas 3 e 12 meses após a cirurgia.

Figura 12 - Descrição da Coorte: Estudo-piloto

5.8.1 Protocolo de extração dos metabólitos fecais

O protocolo de extração dos metabólitos fecais envolveu 5 passos ilustrados na Figura 13 e detalhados a seguir.

PASSO 1: Descongelamento. Após a distribuição em alíquotas, as amostras foram transportadas do LIM/35 até o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas (UNICAMP), em temperatura controlada a - 4ºC. No Laboratório ThoMSon, as amostras contidas nos tubos criogênicos foram descongeladas em temperatura ambiente por 10 minutos [47].

PASSO 2: Separação. Após o descongelamento das amostras, 100 mg de fezes foram retirados do tubo criogênico e inseridos no fundo de um tubo âmbar *light protection* (Eppendorf) de 1,5 mL (Kasvi, Canadá), que foi identificado com o nome da paciente e a data do exame [47].

PASSO 3: Homogeneização. No tubo âmbar contendo 100 mg de fezes, foi inserido 1mL de metanol grau HPLC, (ultrapuro) (HPLC grade, Merck, Alemanha), e, em seguida, os tubos foram colocados em um homogeneizador (Gallenkamp Shaker horizontal) programado em 200 rpm a 25ºC por 15 minutos [47].

PASSO 4: Centrifugação. Após a homogeneização das amostras, foi retirado 1 mL do sobrenadante e inserido em novo tubo âmbar *light protection* (Eppendorf) de 1,5 mL (Kasvi, Canadá), identificado com o nome da paciente e a data do exame. O sobrenadante foi centrifugado (Centrifugue 5415R Eppendorf) a 13.000 rpm a 5°C por 5 minutos, e, em seguida, foi retirado novamente 1 mL de sobrenadante. Este sobrenadante foi inserido em novo tubo âmbar *light protection* (Eppendorf) de 1,5 mL (Kasvi, Canadá), identificado e centrifugado pela segunda vez (Centrifugue 5415R Eppendorf) a 13.000 rpm ou 13 rcf a 5°C por 5 minutos [47].

PASSO 5: Extração. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi inserido em novo tubo âmbar *light protection* (Eppendorf) de 1,5 mL (Kasvi,

Canadá), identificado e armazenado na temperatura de -80°C até a análise dos metabólitos por espectrômetro de massas (EM) [47].

5.8.2 Análise dos metabólitos por Espectrômetro de Massas: estudo-piloto

As amostras fecais foram submetidas a análises metabolômicas realizadas com abordagem *untargeted*, por meio de cromatografia líquida (HPLC Agilent 1290) acoplada ao Espectrômetro de Massas (6550 iFunnel Q-TOF, Agilent Technologies), denominadas em conjunto no presente estudo como LC-MS. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Zorbax extend-c18, 2,1 50 mm, 1,8 u, *Agilent Technologies*), e os dados dos espectros gerados foram salvos em arquivos de Excel (Office – Microsoft) para posterior processamento de dados [55].

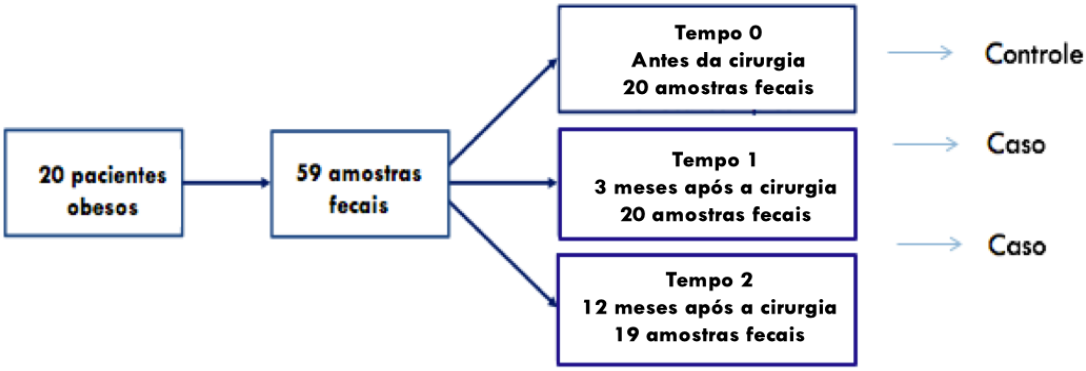
5.8.3 Processamento dos dados e estatística do estudo-piloto

O processamento dos dados gerados pelo espectrômetro de massas foi executado pela empresa Orus Biotechnology (São Paulo, Brasil). Foi feita análise estatística multivariada não supervisionada, utilizando Análise de Componentes Principais (PCA), com auxílio dos *softwares Solutions Lab* (Shimadzu, Califórnia, EUA) e Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA). Após a realização de PCA, foi feita a análise PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares*), com auxílio do software Pirouette 3:11 (Infometria Inc, EUA). Nesse teste, foram identificados os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos [133,134].

5.9 Análise metabolômica *targeted*

Realizou-se análise metabolômica com abordagem *targeted em amostras fecais* para a quantificação de ABs. Essa fase do estudo envolveu 20 pacientes, e todas as amostras foram analisadas em três períodos (pré-

operatório e pós-operatórios de 3 e 12 meses após DGYR), como esquematizado na Figura 13.



Legenda - Vinte amostras foram coletadas antes da cirurgia (DGYR), outras 20 amostras foram coletadas no pós-operatório de 3 meses e 19 amostras pós-operatório de 12 meses (não foi possível realizar as coletas de uma paciente pós-operatório tardio devido à sua mudança de cidade).

Figura 13 - Descrição da Coorte: Análise Metabolômica *Targeted*

A seguir, descrevemos as etapas que compuseram o estudo.

PASSO 1: As alíquotas de fezes das 20 pacientes incluídas foram enviadas para a Áustria, em temperatura controlada pela empresa World Courier (São Paulo, Brasil). As análises foram processadas pela Biocrates® (Innsbruck, Áustria), utilizando padrão de metabólitos para ácidos biliares. As amostras fecais foram analisadas por LC-MS (AB SCIEX, ThermoScientific, Waters), com ionização por *electrospray* (ESI). As análises foram conduzidas em múltiplas etapas de seleção, e o instrumento foi ajustado para realizar a fragmentação de íons (MS/MS), de modo a favorecer a identificação dos metabólitos de interesse.

PASSO 2: Na Biocrates, previamente às análises, as amostras das pacientes foram identificadas e numeradas.

PASSO 3: O kit Ácidos Biliares (Biocrates Bile Acids Kit) foi utilizado para a quantificação de 20 ABs, dados como moléculas de interesse. As análises foram conduzidas por LC-MS/MS utilizando uma coluna de fase reversa altamente seletiva. As análises foram conduzidas no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) negativo, para determinar a concentração de ABs. Para quantificação precisa, foram utilizados padrões internos e calibração externa. Foram extraídos 10 µL de volume da amostra biológica para essa análise.

5.9.1 Ferramentas de software utilizadas

O software interno da Biocrates, MetIDQTM (Innsbruck, Áustria), foi aplicado para exportação de dados, utilizando a plataforma on-line não comercial chamada *MetaboAnalyst* 3.0 (www.metaboanalyst.ca) [135].

O *MetaboAnalyst* fornece dois métodos mais comumente utilizados para essa finalidade: (1) Método de diferença menos significativa de *Fisher* (LSD de *Fisher*) e (2) Diferença Honestamente Significativa de Tukey (HSD de Tukey).

5.9.2 Pré-processamento de dados

Os metabólitos contendo mais de 20% dos valores abaixo do limite de detecção (LOD) foram removidos e, de acordo com esse critério, 6 ácidos biliares foram excluídos da análise estatística.

5.9.3 Métodos estatísticos

Diferentes métodos estatísticos foram aplicados com o objetivo de identificar diferenças nas concentrações de metabólitos fecais antes e após a DGYR.

As características importantes foram selecionadas usando um limiar para o nível de significância com valor até 0,05 após a correção do teste múltiplo. Vinte metabólitos e uma razão entre ABs primários (CA/CDCA) foram calculados e testados [136].

5.9.3.1 Análises univariadas

a. ANOVA unidirecional

Os métodos de análise univariada são os mais comumente utilizados para a análise exploratória de dados. Utilizamos neste trabalho a análise de variância (ANOVA) para avaliar se a comparação global foi significativa, ou não.

b. *Fold change*

Fold change descreveu o quanto a concentração dos ácidos biliares mudou entre os períodos.

c. Teste t de *student*

O teste t de *student* é um teste de hipótese que usa a estatística para rejeitar, ou não, uma hipótese nula. Consideramos o ponto de corte para p-valor de 5%, com nível de confiança de 95% [137].

d. *Wilcoxon*

O teste de *Wilcoxon* é um teste de hipótese não paramétrico que foi utilizado para comparar duas amostras relacionadas, é um teste de diferenças pareadas [138].

e. *Mann-Whitney*

O teste U de *Mann-Whitney* é um teste não paramétrico que foi aplicado em duas amostras independentes. O teste de *Mann-Whitney* foi usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais [139].

6 Resultados

6 RESULTADOS

O presente estudo testou a hipótese de que o perfil de metabólitos fecais de mulheres obesas portadoras de DM2 está alterado após a DGYR e que modificações na classe de ácidos biliares podem estar relacionadas com a melhora do DM2 pós-operatório.

Das 20 pacientes selecionadas, 20 completaram o protocolo até três meses após a DGYR, e 19 pacientes completaram-no em 3 e 12 meses (uma paciente mudou de cidade, e não foi possível coletar amostra fecal).

Para melhor compreensão, os resultados serão apresentados na seguinte ordem: I. Características descritivas da amostra, II. Análise metabolômica *untargeted*, III. Análise metabolômica *targeted*, IV. Correlação entre ácidos biliares fecais e remissão do diabetes mellitus tipo 2, IV a. Correlação entre ácidos biliares fecais e colecistectomia, IV b. Correlação entre ácidos biliares fecais e remissão do diabetes mellitus tipo 2 excluindo pacientes colecistectomizadas.

6.1 Características descritivas da amostra

6.1.1 Variáveis antropométricas

A caracterização antropométrica de 20 mulheres participantes por ocasião da admissão, três meses e um ano após a DGYR, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Características antropométricas de pacientes na admissão, 3 meses e 12 meses após a DGYR

Variáveis	**Pré-operatório Média ± DP**	**Pós-operatório. 3 meses Média ± DP**	**Pós-operatório. 12 meses Média ± DP**	valor p[1]
Idade (anos)	48,65 ± 7,2	48,65 ± 7,2	49,65 ± 7,2	-
Altura (m)	1,57 ± 0,07	1,57 ± 0,07	1,57 ± 0,07	-
Peso (kg)	114,47 ± 15,94	94,16 ± 13,82	80,11 ± 11,48	P<0,001 [a,b]
IMC (kg/m^2)	46,40 ± 5,37	37,94 ± 4,22	32,49 ± 3,86	P<0,001 [a,b]
Circunferência da cintura (cm)	126,9 ± 13,36	111,2 ± 11,76	103,3 ± 11,91	P<0,001 [a,b]
Circunferência do braço (cm)	42,99 ± 5,23	36,8 ± 3,9	33,73 ± 3,78	P<0,001 [a,b]
Circunferência do quadril (cm)	138,46 ± 12,26	123,11 ± 11,62	112,25 ± 9,91	P<0,001 [a,b]

Legenda: IMC, Índice de Massa Corporal; Pós-op., pós-operatório

Os resultados expressos como média (DP: desvio padrão) por meio do teste ANOVA, considerando estatística significante valores de p ≤ 0,05. Sendo a. valor de p para admissão *versus* período pós-operatório de 3 meses e b. valor de p para o período pós-operatório de 3 meses *versus* pós-operatório de 12 meses

Após 3 meses da DGYR, observou-se perda significativa de peso corpóreo e, como consequência da perda de peso, também houve redução dos valores de IMC (p <0,001). As medidas de circunferência do braço, circunferência da cintura e circunferência do quadril apresentaram reduções significativas no terceiro mês após a DGYR, quando comparadas aos valores encontrados no período pré-operatório (p <0,001). Os resultados para essas mesmas variáveis também foram significativos quando comparados os períodos pós-operatórios entre 3 e 12 meses (p <0,001).

6.1.2 Consumo alimentar

Observou-se diminuição significativa no consumo de calorias, carboidratos, proteínas e gorduras após 3 e 12 meses da DGYR, quando comparada ao período pré-operatório avaliado pelo registro alimentar de 7 dias (R7d), exposto na Tabela 02, e pelo recordatório alimentar de 24 horas (R24h), apresentado na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas para a maioria dessas variáveis entre os períodos pós-operatórios de 3 e 12 meses, com exceção de gorduras poli-insaturadas, cuja ingestão foi significativamente menor após 12 meses da cirurgia, e de carboidratos, cuja ingestão foi significativamente maior após 12 meses da cirurgia comparada com o período pós-operatório precoce (3 meses) da DGYR.

Tabela 2 - Alterações no consumo calórico e de macronutrientes por mulheres obesas submetidas à DGYR, conforme dados obtidos pela aplicação do registro alimentar de 7 dias

Variáveis	Pré-operatório	Pós-operatório 3 m	Pós-operatório 12 m	P *Valor* (1)	P *Valor* (2)	P *Valor* (3)
Calorias (kcal)	1677,6 (972,3 - 2625,0)	1004,2 514,9 - 1382,8	985,2 748,7 - 1864,9	**< 0,001**	**< 0,001**	0,07
Proteínas (g)	71,4 (43,0 - 89,8)	47,7 22,5 - 82,7	57,3 24,1 - 86,2	**< 0,001**	**0,007**	0,128
Carboidratos (g)	203,3 (120,1 - 348,5)	108,5 65,7 - 193,9	129,8 64,8 - 264,1	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,037**
Fibras Totais (g)	13,8 (6,5 - 31,1)	9,4 4,1 - 17,7	9,7 4,4 - 15,4	**0,001**	**0,002**	0,783
Fibras Insolúveis (g)	3,4 (1,4 - 6,3)	2,3 0,9 - 4,2	2,5 0,7 - 4,5	**0,02**	**0,004**	0,6
Fibras Solúveis (g)	1,89 (0,6 - 3,6)	1,1 0,6 - 3,2	1,5 0,2 - 3,3	**0,019**	**0,012**	0,388
Gorduras Totais (g)	62,2 (34,8 - 99,5)	38,8 19,1 - 52,9	37,9 26,5 - 53,6	**< 0,001**	**< 0,001**	0,886
Gorduras Saturadas (g)	15,7 98,1 - 28,2)	8,9 5,2 - 17,3	9,7 5,1 - 16,4	**< 0,001**	**< 0,001**	0,841
Gorduras Monoinsaturadas (g)	16,52 8,2 - 26,3	12,0 4,7 - 17,2	11,4 7,3 - 17,7	**< 0,001**	**0,002**	0,654
Gordura Poli-insaturada (g)	12,1 6,5 - 18,3	8,5 5,7 - 10,3	6,3 3,8 - 8,9	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
Colesterol (mg)	194,1 62,3 - 343,7	125,5 52,4 - 334,2	136,2 59,9 - 331,4	**0,007**	**0,004**	0,784

Legenda: p valor (1) 3 meses pós-operatório *vs*. pré-operatório; p valor (2) 12 meses pós-operatório *vs*. pré-operatório; p valor (3) 12 meses pós-operatório *vs*. 3 meses pós-operatório. Resultados obtidos por Teste T e *Mann-Whitney* expressos como mediana (valor mínimo - máximo). Valores em negrito indicam diferença estatística significante ($p < 0,05$)

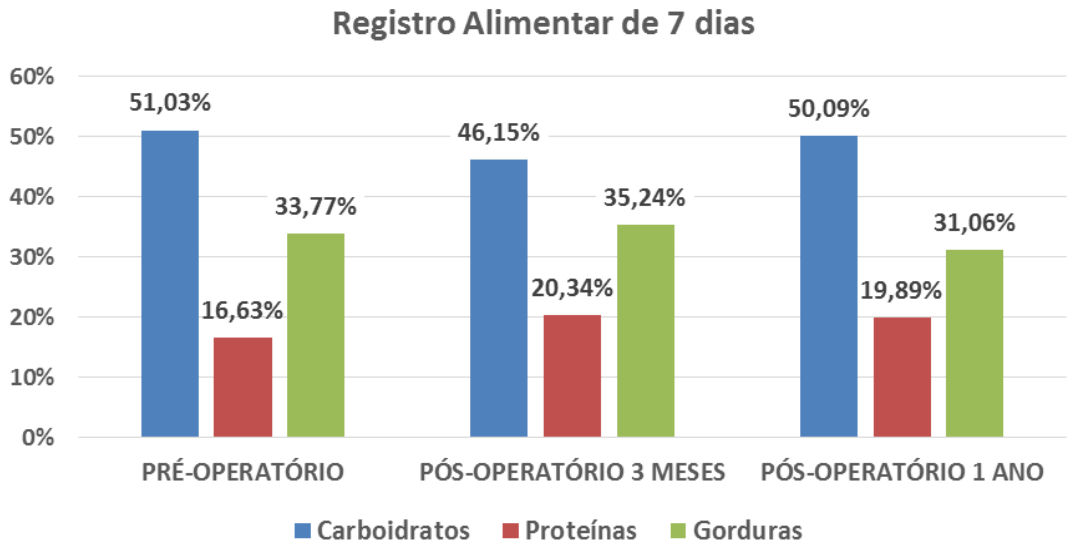
Tabela 3 - Alterações no consumo calórico e de macronutrientes por mulheres obesas submetidas à DGYR, conforme dados obtidos pela aplicação do recordatório alimentar de 24 horas

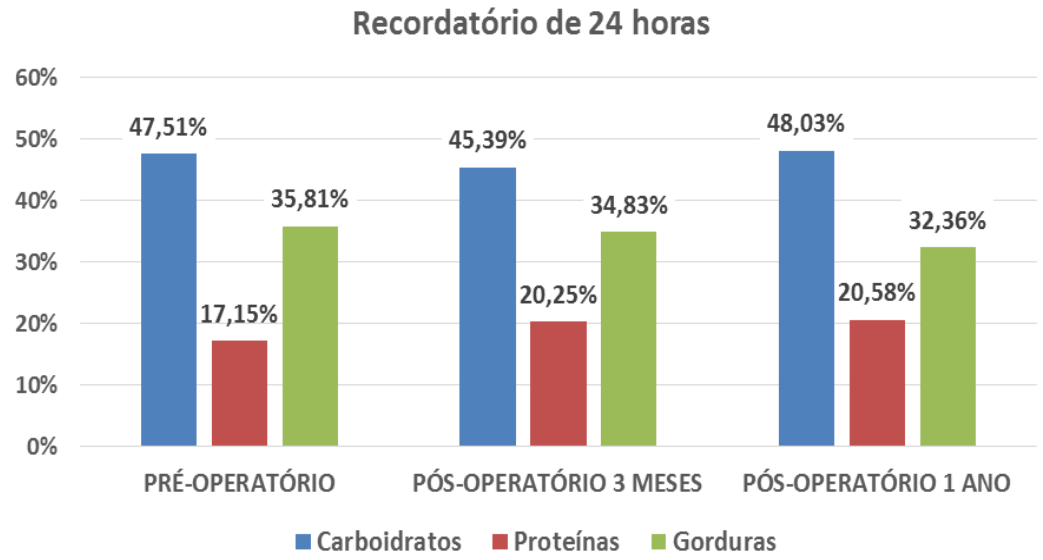
Variáveis	Pré-operatório Total (mínimo-máximo)	Pós-operatório 3 m	Pós-operatório 12 m	P *Valor* (1)	P *Valor* (2)	P *Valor* (3)
Calorias (kcal)	1771,8 707,6 - 2852,1	988,0 261,7 - 1946,6	878,8 471,3 - 1658,24	**< 0,001**	**< 0,001**	0,249
Proteína (g)	69,2 30,2 - 136,4	50,9 4,9 - 97,2	43,5 11,8 - 88,1	**< 0,001**	**< 0,001**	0,321
Carboidrato (g)	200,5 82,5 - 446,0	104,4 14,2 - 261,2	113,3 39,1 - 156,6	**< 0,001**	**< 0,001**	0,546
Fibra Total (g)	13,3 3,8 - 34,8	7,2 1,2 - 15,8	9,0 2,4 - 17,1	**< 0,001**	**0,017**	0,212
Fibra Insolúvel (g)	3,7 0,5 - 15,9	1,3 0,4 - 3,5	2,4 0,2 - 9,2	**< 0,001**	**0,027**	0,07
Fibra Solúvel (g)	2,4 0,2 – 11,2	0,8 0,2 – 2,7	1,3 0,1 - 3,7	**< 0,001**	**0,005**	0,059
Gordura Total (g)	65,0 22,3 - 143,0	40,3 4,3 - 78,9	28,3 9,4 - 87,0	**0,004**	**< 0,001**	0,114
Gordura Saturada (g)	15,3 3,5 – 39,6	9,4 0,5 - 27,9	6,4 0,2 - 406,7	**0,019**	**0,005**	0,388
Gordura Monoinsaturada (g)	15,4 4,8 - 71,6	11,0 0,2 – 20,0	7,8 0,4 - 475,0	**< 0,001**		0,841
Gordura Poli-insaturada (g)	15,6 4,8 - 28,7	7,1 0,2 - 17,6	4,9 0,7 - 13,4	**0,002**	**< 0,001**	**0,012**
Colesterol (mg)	183,8 75,6 - 821,0	108,5 0,2 – 499,0	89,8 0 - 224,87	**0,025**	**0,014**	0,546

Legenda: p valor (1) 3 meses pós-operatório *vs*. pré-operatório; p valor (2) 12 meses pós-operatório *vs*. pré-operatório; p valor (3) 12 meses pós-operatório *vs*. 3 meses pós-operatório. Resultados obtidos por Teste T e *Mann-Whitney* expressos como mediana (valor mínimo - máximo). Valores em negrito indicam diferença estatística significante ($p < 0,05$)

Ao comparar os dados obtidos por R24h e R7d, não se observaram diferenças significativas em relação ao consumo de macronutrientes em todos os períodos avaliados. Valores obtidos por ambos, R24h e R7d, mostraram ainda distribuições similares de macronutrientes, com prevalência no consumo de carboidratos, seguido de proteínas e gorduras em todos os períodos avaliados (Gráfico 01; $p \geq 0,05$).

Gráfico 1 - Distribuição de macronutrientes (g) ingeridos por mulheres obesas antes, 3 e 12 meses após a DGYR, conforme dados obtidos por registro alimentar de 7 dias e recordatório alimentar de 24 horas





6.1.3 Resposta clínica

As participantes do estudo foram distribuídas de acordo com os subgrupos responsivo (R) e não responsivo (NR) em relação à remissão pós-operatória do DM2. As mulheres do grupo NR pesaram na admissão 119,5± 37,6kg, e as R pesaram 113,2 ± 60,1kg. As NR informaram estar diabéticas por 4 anos, e as R por 6 anos. Clinicamente, após 3 e 12 meses da DGYR, as pacientes dos grupos R e NR apresentaram melhora do grau de obesidade, refletida pela diminuição significativa do peso e IMC (Tabela 04). Também se observou melhora nos marcadores da homeostase glicêmica em nível sistêmico, que incluíram menores valores de glicose, HbA1c e peptídeo C (Tabela 4). Todas as variáveis observadas mostraram-se significativamente diferentes ao se comparar as medidas no período pré-operatório com as do pós-operatório, em separado, para os grupos R e NR. No entanto, não se observaram diferenças ao se comparar, em cada período, as variáveis medidas nos subgrupos R e NR entre si, exceto para a glicemia, que foi significativamente menor nos períodos de 3 e 12 meses pós-operatório para o grupo R, assim como a hemoglobina glicada (HbA_{1c}) aos 12 meses de pós-operatório.

Tabela 4 - Dados de antropometria e bioquímicos de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes, 3 e 12 meses após a DGYR

Variável	Responsivos			Não responsivos			P valor*	P valor¥	P valorϕ
	Pré-operatório	Pós-operatório		Pré-operatório	Pós-operatório				
		3 meses	1 ano		3 meses	1 ano			
Peso	113.2 ± 60,1	90.4 ± 45,5	73.9 ± 37,2	119.5 ± 37,6	99.8 ± 33,7	89.1 ± 28,2	0.571	0.384	0.062
IMC	46.4 ± 20,4	38.5 ± 15,3	32.4 ± 12,7	46.2 ± 14,8	38.2 ± 11,2	33.0 ± 11,3	0.678	0.571	0.600
Glicemia	200.0 ± 244	91.5 ± 78	85.0 ± 31	216.0 ± 172	111.5 ± 72	108.0 ± 38	0.427	**0.025**	**0.031**
Peptídeo C	4.2 ± 4,7	2.5 ± 1,2	2.3 ± 1,3	3.5 ± 3,5	2.8 ± 2,4	2.4 ± 1,6	0.351	0.999	0.384
Insulina	18.1 ± 38,1	7.5 ± 12,6	6.6 ± 6,4	12.9 ± 38,6	7.9 ± 9,5	6.7 ± 10,6	**0.020**	0.884	0.792
HbA_{1c}	8.6 ± 6,5	6.2 ± 1,5	5.4 ± 1,1	9.7 ± 3,1	6.1 ± 1,5	6.3 ± 0,9	0.384	0.657	**<0.001**
CT	174,18 ± 44,49	161,18 ± 42,13	158,73 ± 41,94	188,62 ± 14,72	153,43 ± 18,26	160,5 ± 23,13	0,334	1	0,62
LDL-c	100,64 ± 33,69	96,82 ± 30,8	88,64 ± 31,68	115,25 ± 18,09	89,43 ± 15,13	90,88 ± 22,15	0,282	0,786	0,866
HDL-c	43,36 ± 10,96	43,09 ± 10,71	52,36 ± 13,43	40,25 ± 8,14	41,71 ± 10,03	53,12 ± 11,47	0,507	0,856	0,899
VLDL-c	30,18 ± 10,68	21,27 ± 9,21	18,5 ± 6,52	33,12 ± 7,77	22,29 ± 7,87	16,5 ± 2,33	0,518	0,555	0,386
TG	171,82 ± 90,99	108,82 ± 50,85	89 ± 33,83	165,88 ± 38,46	112 ± 39,54	81,88 ± 12,74	0,591	0,556	0,533

Legenda - Dados são expressos como média (DP: desvio padrão). Para as análises, foram realizados teste *t de student* e *Mann-Whitney* considerando como estatística significante valores de $p < 0,05$. *Pré-operatório responsivo vs. Pré-operatório não responsivo; ¥ Pós-operatório 3 meses responsivo vs. Pós-operatório 3 meses não responsivo; ϕ Pós-operatório 1 ano responsivo vs. Pós-operatório 1 ano não responsivo; IMC, Índice de Massa Corporal; HbA_{1c}, Hemoglobina glicosilada; CT, Colesterol total; LDL-c, colesterol LDL; HDL-c, colesterol HDL; VLDL-c, colesterol VLDL; TG, triglicerídeos

Resumo dos resultados antropométricos e bioquímicos

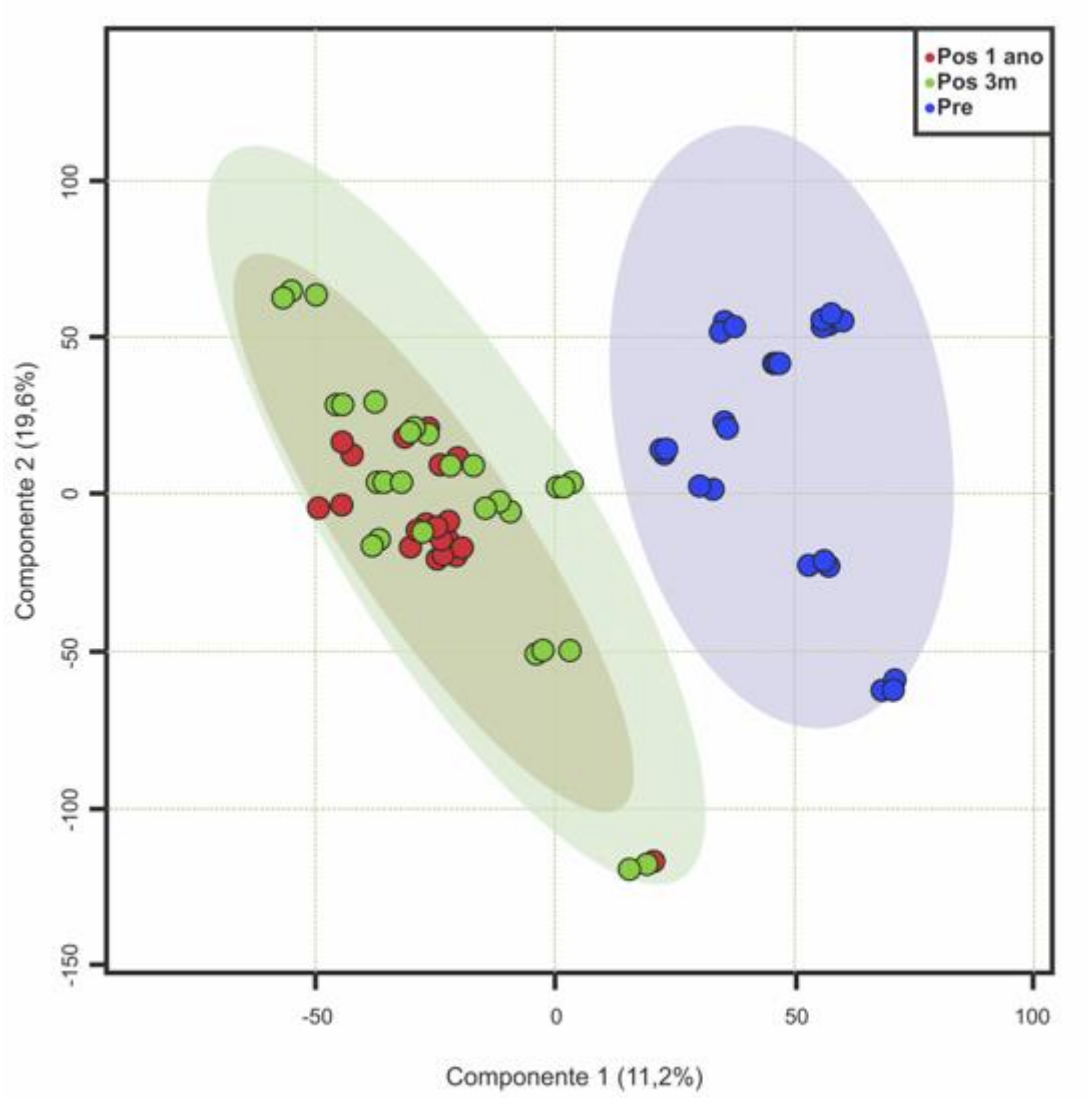
Analisando todas as medidas antropométricas, a DGYR se mostrou eficaz em promover perda significativa de peso, diminuição de IMC, circunferência da cintura, do braço e quadril, comparando simultaneamente os três períodos. Observou-se diminuição significativa no consumo de calorias, carboidratos, proteínas e gorduras após 3 e 12 meses da DGYR, quando comparada ao período pré-operatório por ambos os métodos de avaliação (R7d e R24h). No que se refere aos subgrupos R e NR, níveis de glicemia e hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) foram significativamente menores no grupo R.

6.2 Análise metabolômica *untargeted*

Em estudo-piloto, realizado por meio de análise metabolômica *untargeted,* em 10 pacientes, constatamos alteração do perfil metabolômico fecal na comparação entre os períodos pré-operatório e após 3 meses e 12 meses de DGYR, de acordo com o teste estatístico PLS-Da, em ambos os modos de leitura (positivo e negativo), como ilustrado nos Gráficos 02 e 03, respectivamente.

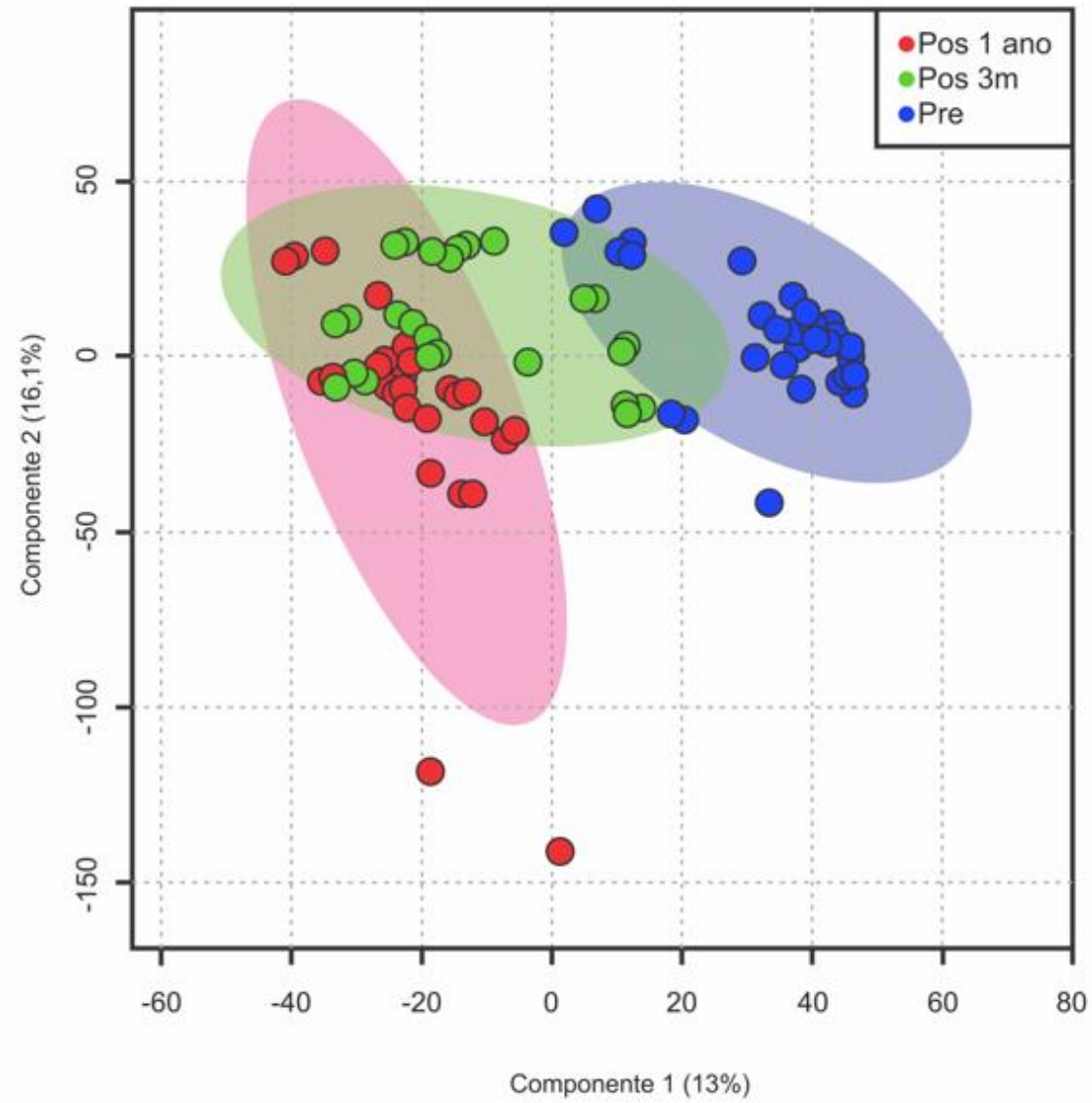
Os grupos de amostras inseridos nos períodos pré-operatório (azul) e pós-operatório estiveram nitidamente separados, enquanto que, nos períodos pós-operatório (pós-operatório de 3 meses *versus* pós-operatório de 12 meses), observamos pouca alteração, sem significância estatística.

Gráfico 2 - Análise *untargeted* fecal de 10 pacientes obesas com DM2 nos 3 períodos da DGYR – PLS-Da Modo Positivo



Legenda - Modo Positivo: Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), conjunto de dados dos metabólitos log2-transformados, limpos e imputados, obtidos a partir de amostras fecais antes (Azul: período pré-operatório – Pré) e após a DGYR. (Verde: pós-operatório de 3 meses – Pos 3 m e Vermelho: pós-operatório de 12 meses – Pos 1 ano). Intervalo de confiança de 95% é mostrado para cada um dos grupos na respectiva cor.

Gráfico 3 - Análise *untargeted* de metabólitos fecais de 10 pacientes obesas com DM2 em 3 períodos da DGYR – PLS- Da Modo Negativo



Legenda - Modo Negativo: Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), conjunto de dados dos metabólitos log2-transformados, limpos e imputados, obtidos a partir de amostras fecais antes (Azul: período pré-operatório – Pré) e após a DGYR. (Verde: pós-operatório de 3 meses – Pos 3 m e Vermelho: pós-operatório de 12 meses – Pos 1 ano). Intervalo de confiança de 95% é mostrado para cada um dos grupos na respectiva cor.

Resumo dos resultados: O estudo-piloto envolvendo 10 pacientes com obesidade e DM2 apontou alteração do perfil metabolômico fecal após a DGYR nos períodos pós-operatórios.

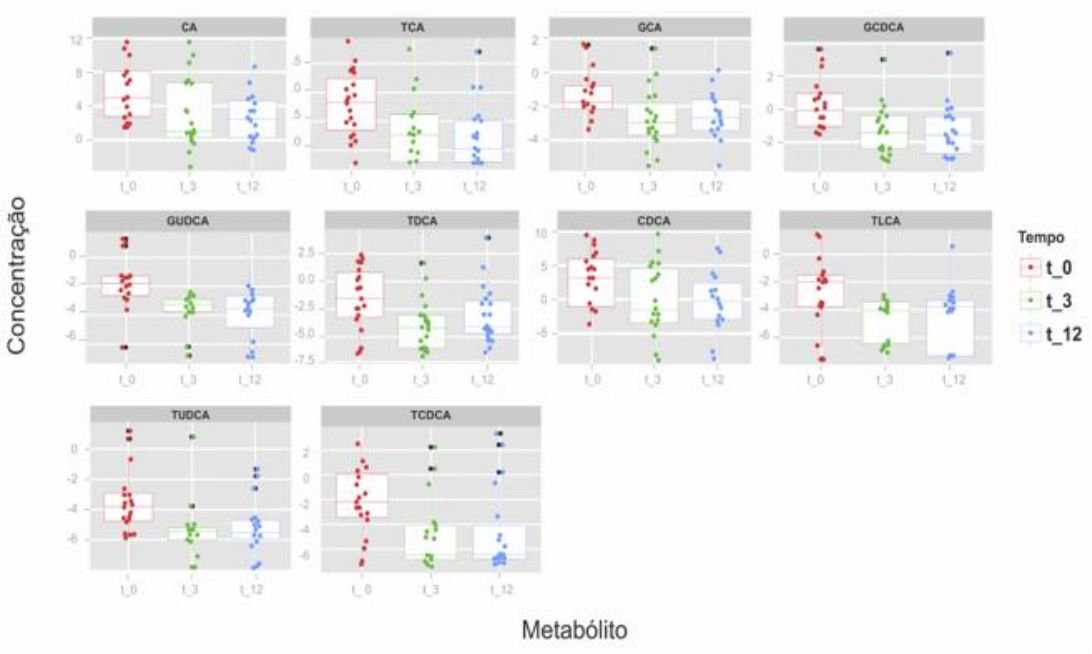
6.3 Análise metabolômica *targeted*

6.3.1 Resposta geral do perfil de ácidos biliares à DGYR

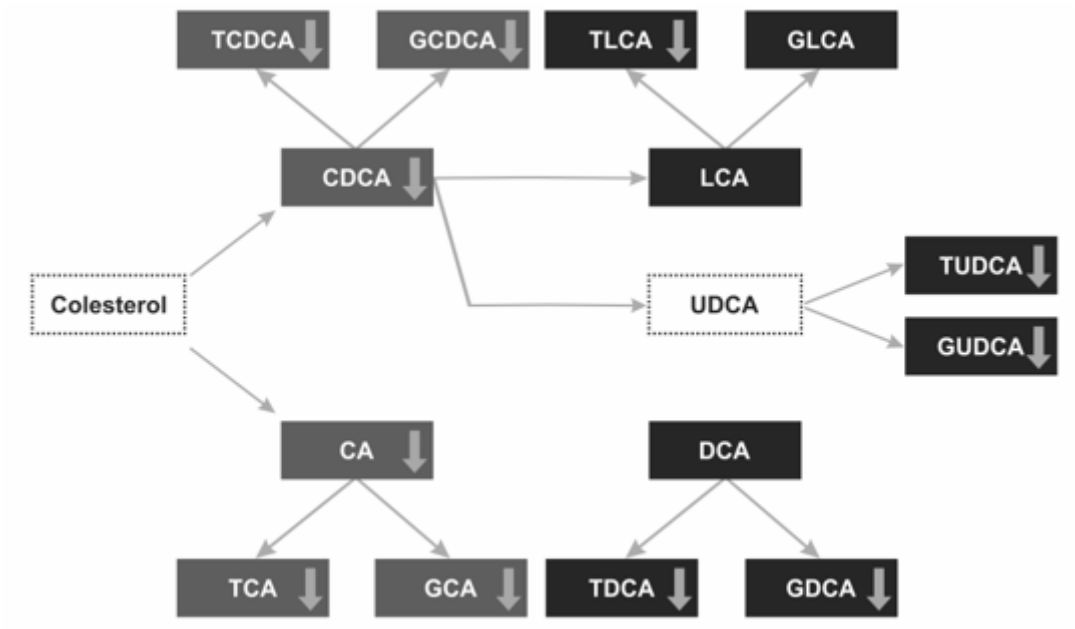
Conforme proposto no plano de pesquisa, aplicou-se o software MetIDQTM (Biocrates®) para exportar os dados dos ácidos biliares (ABs) fecais mensurados por espectrometria de massas, para a plataforma MetaboAnalyst 3.0. Seis ABs com níveis ≥ 20% dos valores abaixo do limite de detecção foram desprezados da análise, dentre eles ácido hiodeoxicólico (HDCA), ácidos muricólicos (MCA.a, MCA.b e MCA.o), ácido tauromuricólico (TMCA.a.b) e ácido ursodeoxicólico (UDCA).

Concentrações de ABs foram normalizadas para o peso das amostras e são apresentadas em pmol/mg. Com o programa R (versão 3.2.2), testaram-se as características de tendência central e de dispersão por meio do teste estatístico ANOVA e significâncias de *fold-changes* por *Benjamini-Hochberg*. Dos 14 ABs fecais mensurados, 10 mudaram significativamente após a DGYR (Gráfico 4). Os níveis de todos esses ABs foram significativamente reduzidos em relação ao período pré-operatório (Figura 14). A análise *fold-change* confirmou a diminuição dos níveis dos ácidos glicoquenodeoxicólico (GCDCA), glicocólico (GCA), taurocólico (TCA) e tauroquenodeoxicólico (TCDCA) no pós-operatório de 3 meses (*Benjamini-Hochberg* < 0,05; Tabela 05). Desses, os ABs GCDCA, GCA e TCA permaneceram significativamente reduzidos 12 meses após a DGYR (*Benjamini-Hochberg* < 0,05; Tabela 05). Mudanças nos níveis de ABs entre os períodos pós-operatórios de 3 e 12 meses não obtiveram significância estatística.

Gráfico 4 - Expressão gráfica do comportamento de 10 ácidos biliares fecais nos períodos pré-operatório, pós-operatório de 3 meses e 12 meses de DGYR



Legenda - No gráfico demonstrado em boxplot, são mostrados os ácidos biliares significativamente alterados nos 3 grupos (antes da cirurgia bariátrica (t_0, vermelho), 3 e 12 meses após cirurgia (t_3 verde, t_12 azul), de acordo com o teste ANOVA pareado com valores de $p < 0,05$. Os *outliers* estão destacados por pontos negros adicionais ao lado dos pontos de dados originais. Ácidos biliares primários (CA, CDCA, GCA, GCDCA, TCA e TCDCA), secundários (TLCA e TDCA) e terciários (GUDCA e TUDCA) apresentaram alterações significativas após a DGYR.



Legenda - Os ácidos biliares são apresentados de acordo com o fluxograma de sua síntese a partir do colesterol. Ácidos biliares primários são destacados em caixas cinza, e os ácidos biliares secundários, em caixas escuras. Metabólitos nas linhas tracejadas não foram considerados nessa análise estatística por não terem sido mensurados devido a critérios de qualidade (neste caso, UDCA esteve abaixo do limite de detecção). Diminuições significativas (ANOVA) nos níveis de ácidos biliares fecais após cirurgia bariátrica são indicadas por setas logo após a sigla do AB. Nenhum aumento significativo foi observado. TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GLCA, ácido glicocólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; LCA, ácido licólico; UDCA, ácido ursodeoxicólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; CA, ácido cólico; DCA, ácido deoxicólico; TCA, ácido taurocólico; GCA, ácido glicocólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico; GDCA, ácido glicodeoxicólico.

Figura 14 - Ácidos biliares primários, secundários e terciários em amostras fecais de mulheres obesas, portadoras de DM2 após a DGYR

Tabela 5 - *Fold-changes* significativos de ácidos biliares fecais obtidos aos 3 e 12 meses após a DGYR, em comparação com os obtidos no período pré-operatório

Ácido biliar (abreviatura)	Período pós-operatório			
	3 meses		12 meses	
	FC	p valor	FC	p valor
Ácido glicoquenodeoxicólico (GCDCA)	-1,45	0,02	-1,57	0,02
Ácido glicocólico (GCA)	-1,68	0,02	-1,49	0,02
Ácido taurocólico (TCA)	-2,43	0,03	-2,73	0,03
Ácido tauroquenodeoxicólico (TCDCA)	-2,69	0,03	-	-

Legenda - *Fold-changes* (FC) foram calculados para cada paciente individualmente, seguidos pelo cálculo da média *fold change* para cada AB primário conjugado. Valores negativos representam diminuição na concentração. Nenhuma mudança significativa foi encontrada para a concentração de ABs fecais entre os períodos pós-operatórios de 3 e 12 meses. O nível de significância foi de 0,05 após correção para múltiplos testes usando *Benjamini-Hochberg.*

Resumo dos resultados: A análise metabolômica *targeted* incluindo todas as pacientes inseridas no protocolo de estudo (n=20) confirmou a alteração no perfil metabólico fecal antes e após a DGYR observada no estudo-piloto, e apontou redução significativa de ABs fecais após o procedimento cirúrgico.

6.4 Correlação entre ácidos biliares fecais e remissão de DM2

6.4.1 Remissão de diabetes mellitus tipo 2

De acordo com o critério da ADA[140], apresentado no capítulo de métodos, das 20 pacientes estudadas, 12 (60%) foram classificadas como R, e 8 (40%) como NR. Amostras fecais de todas as pacientes coletadas no pré (T0) e pós-operatórios de 3 (T1) e 12 (T2) meses foram estudadas, com exceção de uma amostra no tempo T2 de uma paciente do grupo R, que mudou de cidade nesse período do estudo. A Figura 15 mostra o diagrama Consort (fluxograma) das amostras fecais analisadas, nos períodos T0, T1 e T2, das pacientes dos grupos de remissão do DM2.

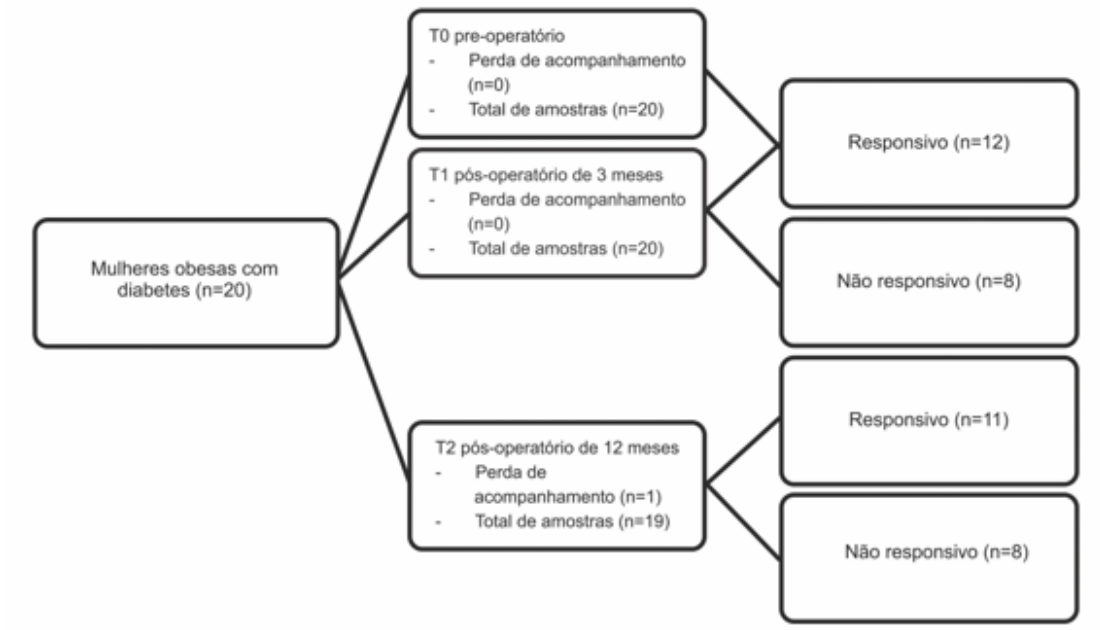


Figura 15 - Diagrama Consort das amostras fecais analisadas, nos períodos pré-operatório (T0) e pós-operatórios de 3 (T1) e 12 (T2) meses, das pacientes dos grupos R e NR à remissão de DM2

6.4.2 Resposta do perfil de ácidos biliares à DGYR, de acordo com a remissão pós-operatória de DM2

As comparações de ABs fecais entre os grupos R e NR foram feitas por meio do teste de *Mann-Withney* [139] e ANOVA, considerando-se nível de significância de 5% e utilizando-se o software R (versão 3.2.2).

Para pacientes do grupo R, ao se comparar o período pós-operatório de 3 meses com o período pré-operatório, encontraram-se níveis fecais diminuídos de ABs deoxicólico (DCA), glicodeoxicólico (GDCA), glicolitocólico (GLCA), glicoursodeoxicólico (GUDCA), litocólico (LCA), TCDCA, taurodeoxicólico (TDCA) e taurolitocólico (TLCA) e tauroursodeoxicólico (TUDCA), e aumento da relação de ácidos cólico e quenodeoxicólico (CA/CDCA) ($p < 0,05$; Tabela 06). Desses ABs, apenas o GUDCA reduziu-se mais no pós-operatório de 12 meses, em comparação ao período pré-operatório. Por outro lado, os metabólitos GLCA e LCA aumentaram

significativamente entre os períodos pós-operatórios (12 meses *vs*. 3 meses). No período pós-operatório de 12 meses, as pacientes do grupo R apresentaram diminuição significativa do metabólito GCDCA em relação ao pré-operatório.

Poucas mudanças foram observadas nos níveis de ABs fecais em pacientes NR após a DGYR, todas bem distintas das alterações encontradas em pacientes R. Em relação ao período pré-operatório, GCDCA (1,99 ± 2,44 vs. 1,42 ± 2,52; p = 0,008) e TCA (1,00 ± 1,45 vs. 0,37 ± 0,54; p = 0,016) mostraram-se reduzidos no pós-operatório de 3 e 12 meses, respectivamente. Diferentemente do observado nas pacientes do grupo R, a razão CA/CDCA também aumentou no grupo NR após a DGYR, mas essa alteração ocorreu no pós-operatório de 12 meses, em comparação com o pós-operatório de 3 meses (3,54 ± 6,01 vs. 0,71 ± 0,47; p = 0,039 - Tabela 07).

Tabela 6 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, de mulheres responsivas (grupo R) à remissão do DM2 antes, após 3 e 12 meses de DGYR e suas comparações

Variável	T0	T1	T2	T0 *vs*. T1	T0 *vs*. T2	T1 *vs*. T2
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	p valor	p valor	p valor
CA/CDCA	1,51 ± 0,84	3,06±2,04	2,04 ± 4,01	0,010	0,206	0,102
DCA	2791,67 ± 2469,78	1393,2 ± 1923,81	1773,09 ± 1371.79	0,042	0,173	0,093
GDCA	3,34 ± 2,68	1,57 ± 1,95	1,89 ± 0.82	0,007	0,102	0,067
GLCA	0,53 ± 0,49	0,26 ± 0,27	0,37 ±0,19	0,012	0,320	0,032
GUDCA	0,32 ± 0,42	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,05	0,016	0,007	0,634
LCA	1154,53 ± 1168,66	515,95 ± 565,97	760,36 ±463,9	0,027	0,413	0,014
TCDCA	1,05 ± 1,68	0,16 ± 0,42	0,51 ± 1,65	0,042	0,083	0,700
TDCA	1,66 ± 1,87	0,20 ± 0,37	1,76 ± 5.28	0,007	0,102	0,175
TLCA	0,41 ± 0,50	0,08 ± 0,07	0,17 ± 0,36	0,003	0,054	0,765
GCDCA	2,27± 3,51	0,56 ± 0,61	0,38 ±0,29	0,092	0,005	0,831
TUDCA	0,33 ± 0,48	0,03 ± 0,01	0.05 ± 0.05	0,001	0,001	0,520

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; CA/CDCA, razão de ácidos cólico e quenodeoxicólico; DCA, ácido deoxicólico; GDCA, ácido glicodeoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; LCA, ácido

litocólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TDCA; ácido taurodeoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico, TUDCA; ácido tauroursodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*

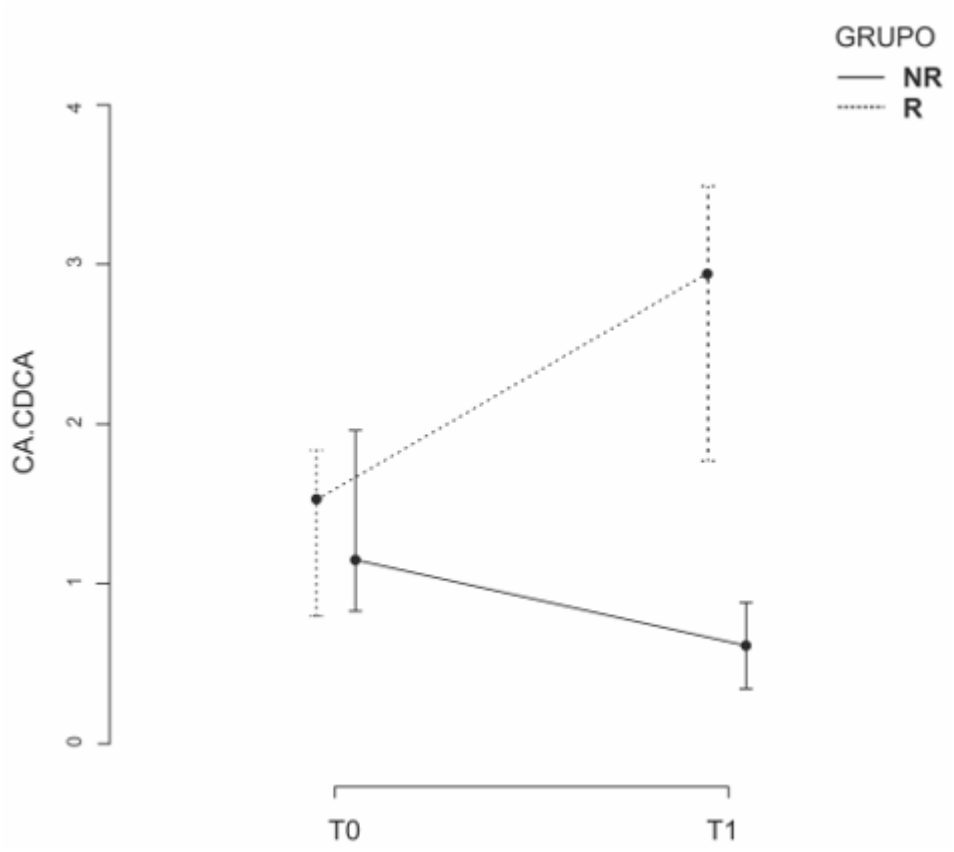
Tabela 7 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, de mulheres não responsivas (grupo NR) à remissão do DM2 antes, após 3 e 12 meses de DGYR e suas comparações

Ácido biliar fecal	T0	T1	T2	T0 *vs*. T1	T0 *vs*. T2	T1 *vs*. T2
	Média ± DP	**Média ± DP**	**Média ± DP**	**p valor**	**p valor**	**p valor**
CA/CDCA	1,59±1.14	0,71 ± 0,47	3,54 ± 6.01	0,055	0,945	**0,039**
TCA	01,00 ± 1.45	1,62 ± 4.18	0,37 ± 0.54	0,641	**0,016**	1,000
GCDCA	1,99 ± 2,44	1,44 ± 2,52	1,42 ± 2.52	**0,008**	0,250	0,742

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 mês; T2, pós- operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; razão CA/CDCA de ácidos cólico e quenodeoxicólico; TCA, ácido taurocólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

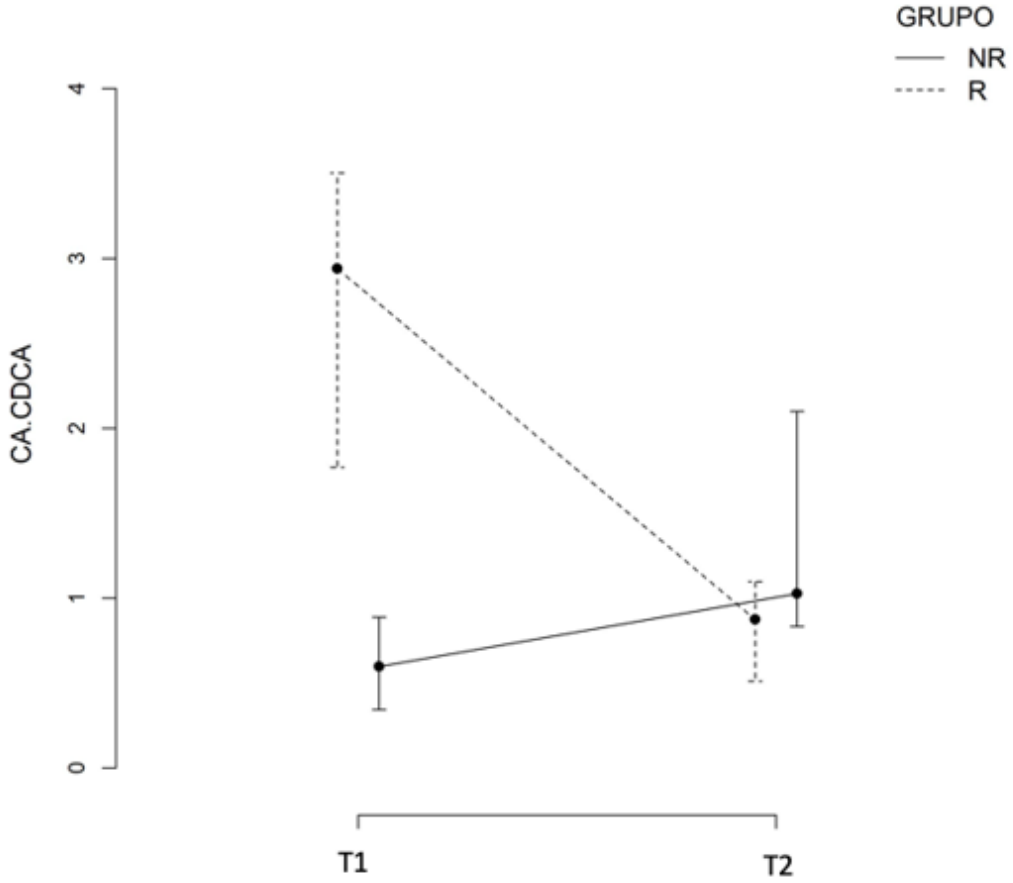
As alterações no comportamento da razão CA/CDCA fecal e dos níveis de TUDCA após a DGYR foram associadas com remissão pós-operatória de DM2. Em comparação ao período pré-operatório, a razão CA/CDCA aumentou no grupo R e diminuiu em pacientes NR no pós-operatório de 3 meses (p = 0,0001; Gráfico 5A), diferentemente do que ocorreu entre os períodos dos pós-operatórios de 3 e 12 meses (p = 0,0039 Gráfico 5B). Apenas as pacientes R apresentaram níveis significativamente reduzidos de TUDCA 12 meses após a DGYR (p = 0,0327; Gráfico 5C) em relação ao período pré-operatório. Essas alterações pós-operatórias no comportamento da razão CA/CDCA e nos níveis de TUDCA foram capazes de distinguir pacientes R das NR, de acordo com o teste ANOVA.

Gráfico 5A - Razão CA/CDCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e período pré-operatório em mulheres R e NR após a DGYR



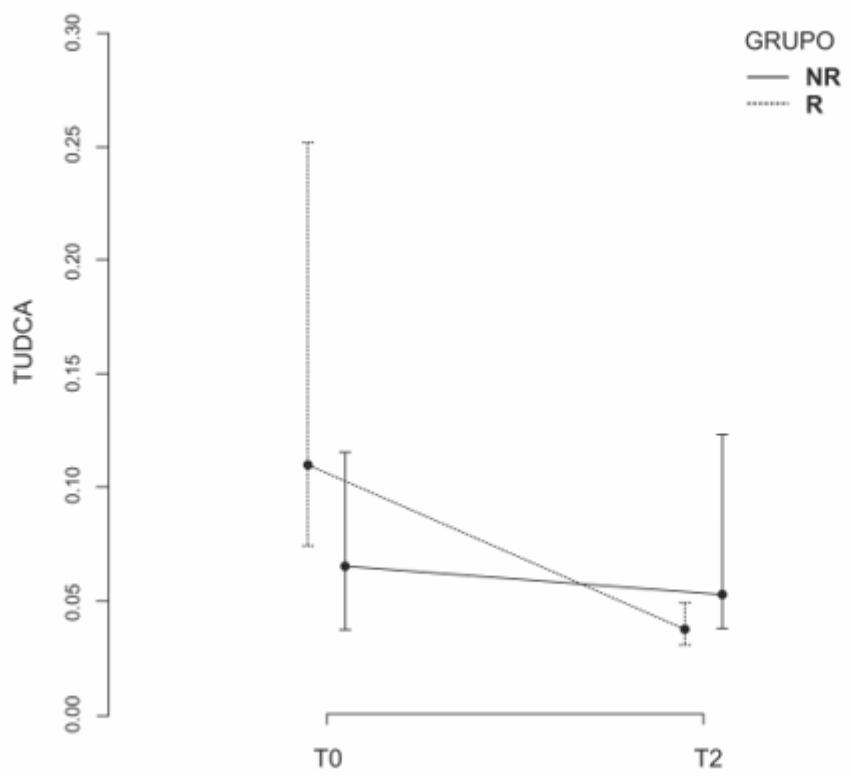
Legenda - R responsivo; NR não responsivo; T0 pré-operatório; T1 pós-operatório de 3 meses

Gráfico 5B - Razão CA/CDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 e 3 meses em mulheres R e NR após a DGYR



Legenda - R responsivo; NR não responsivo; T1 pós-operatório de 3 meses; T2 pós-operatório de 12 meses

Gráfico 5C - TUDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e período pré-operatório em mulheres R e NR após a DGYR



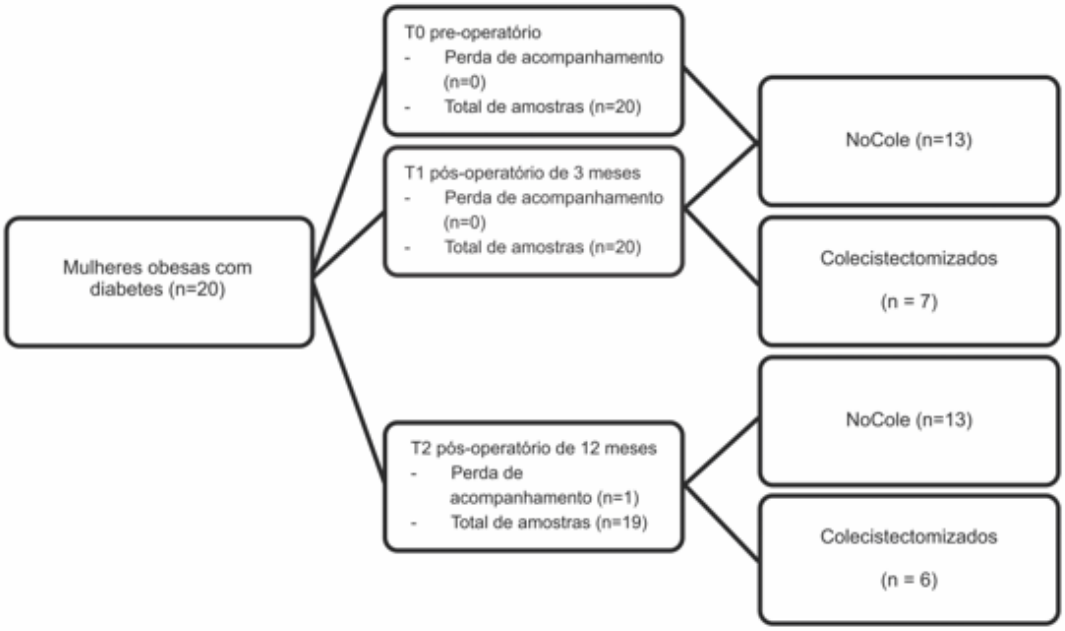
Legenda - R responsivo; NR não responsivo; T0 pré-operatório; T2 pós- operatório de 12 meses

Resumo dos resultados: O ácido biliar TUDCA e a razão CA/CDCA estiveram significativamente associados com a remissão do DM2 pós-operatória. Enquanto a alteração significativa no metabólito TUDCA ocorreu no período pós-operatório de 12 meses, a razão CA/CDCA esteve fortemente associada com a remissão de DM2 no período pós-operatório de 3 meses. No pós-operatório de 12 meses, comparado com o de 3 meses, houve aumento significativo nos níveis da razão CA/CDCA no grupo NR, de acordo com o teste ANOVA.

6.4.3 Correlação entre ácidos biliares fecais e colecistectomia

A colecistectomia é um procedimento cirúrgico frequentemente realizado em pacientes obesos. Observamos que algumas de nossas pacientes foram submetidas a essa cirurgia e, ao considerar a relação direta da vesícula biliar na flutuação de ABs e na circulação entero-hepática, identificamos a necessidade de avaliar se a colecistectomia poderia interferir nos resultados obtidos. Assim, realizamos uma série de análises estatísticas correlacionando a colecistectomia com o perfil de ABs e a remissão do DM2.

Das 20 pacientes estudadas, 7 (35%) foram colecistectomizadas e 13 (65%) não, nomeadas COLE e NOCOLE, respectivamente. Amostras fecais de todas as pacientes coletadas no pré (T0) e pós-operatórios de 3 (T1) e 12 (T2) meses foram estudadas. A Figura 16 mostra o fluxograma das amostras fecais de pacientes COLE e NOCOLE analisadas nos períodos T0, T1 e T2.



Legenda - No tempo T2, uma paciente do grupo COLE se mudou de cidade e, por isso, contamos com o N=6

Figura 16 - Diagrama de Consort das amostras fecais de pacientes COLE e NOCOLE analisadas nos períodos estudados

As comparações de ABs fecais entre os grupos COLE e NOCOLE foram feitas por meio do teste de *Mann-Withney* e ANOVA, considerando-se nível de significância de 5% e utilizando-se o software R (versão 3.2.2). Nós realizamos comparações entre os grupos e também intragrupos avaliando a variação nos níveis de AB fecais de acordo com o tempo. Os resultados serão apresentados de acordo com cada teste estatístico.

6.4.3.1 Diferença no perfil de ABs fecais entre pacientes COLE *versus* NOCOLE de acordo com o tempo. Teste de *Mann Whitney*

O perfil de ABs fecais foi diferente entre pacientes COLE e NOCOLE antes e após a DGYR. No período pré-operatório, as pacientes do grupo COLE tiveram níveis significativamente maiores dos ácidos biliares primários CA (p = 0,046) e CDCA (p= 0,037), e primários conjugados GCDCA (p=0,001) e TCDCA (p=0,009) e também da razão CA/CDCA (p=0,047) quando comparados com os NOCOLEs. No período do pós-operatório precoce (3 meses), apenas os ácidos biliares primários desconjugados, CA (p=0,014) e CDCA (p=0,005), estiveram significativamente aumentados no grupo COLE em relação ao NOCOLE. E, no período pós-operatório de 12 meses, apenas o metabólito secundário conjugado à taurina (TLCA) foi significativamente maior no grupo COLE em relação ao NOCOLE (p=0,009) (Tabela 8).

Tabela 8 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 COLE *versus* NOCOLE antes e após 3 e 12 meses de DGYR

Variável	NOCOLE (n=13) T0 Média ± DP	COLE (n=7) T0 Média ± DP	P valor T0	NOCOLE (n=13) T1 Média ± DP	COLE (n=7) T1 Média ± DP	P valor T1	NOCOLE (n=13) T2 Média ± DP	COLE (n=6) T2 Média ± DP	P valor T2
CA	169,86 ± 441,74	899,43 ± 1193,92	**0,046**	81,53 ± 251,07	688,41± 1159,25	**0,014**	45,8 ± 108,92	75,26 ± 156,61	0,579
CDCA	122,67 ± 310,85	524,54 ± 676,73	**0,037**	53,1 ± 135,44	468,2 ± 775,97	**0,005**	54,7 ± 152,47	87,1 ± 172,31	0,21
GCDCA	0,87 ± 0,64	4,3 ± 4,28	**0,001**	0,51 ± 0,43	1,62 ± 2,72	0,485	1,16 ± 2,62	0,48 ± 0,39	0,966
TCDCA	0,31 ± 0,42	1,78 ± 1,94	**0,009**	1,78 ± 1,94	0,71 ± 1,77	0,938	0,89 ± 2,78	1,03 ± 2,2	0,368
TLCA	0,46 ± 0,59	0,18 ± 0,15	0,438	0,07 ± 0,05	0,08 ± 0,07	0,07	0,05 ± 0,04	0,31 ± 0,46	**0,009**
CA/CDCA	2,94 ± 5,68	1,11 ± 0,90	0,364	4,06 ± 4,56	1,88 ± 1,28	0,197	0,92 ± 0,44	1,90 ± 1,39	**0,047**

Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0, pré- operatório; T1, pós- operatório de 3 meses; T2, pós- operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico e CA/CDCA, razão entre os ácidos cólico e quenodeoxicólico. Os valores de p referem-se às comparações de cada metabólito entre COLE e NOCOLE para cada distinto tempo analisado. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[144]

6.4.3.2 Diferença no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes COLE de acordo com o tempo. Teste de *Mann-Whitney*.

No grupo COLE, a comparação entre o período pré-operatório e pós-operatório de 3 meses não apontou diferença significativa em nenhum AB (Tabela 9). No entanto, a comparação entre o período pós-operatório de 12 meses com o período pré-operatório mostrou 4 ABs primários fecais reduzidos, 2 deles foram ABs primários desconjugados, CA (p=0,031) e CDCA (p=0,031), e 2 ABs nas suas formas conjugadas à glicina, (GCA (p=0,031) e GCDCA (p=0,031) (Tabela 10). Apenas um AB secundário conjugado à glicina esteve significativamente reduzido no pós-operatório de 12 meses comparado com o pós-operatório de 3 meses (GUDCA p=0,031) (Tabela 11).

Tabela 9 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e DM2 do grupo COLE, no período pós-operatório de 3 meses *versus* período pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ±DP	T1 Média ± DP	T0 vs. T1 valor p
CA	899,43 ± 1193,92	688,41 ± 1159,25	0,578
CDCA	524,54 ± 676,73	468,2 ± 775,97	0,938
GCA	3,99 ± 4,88	1,74 ± 3,25	0,109
GCDCA	4,3 ± 4,28	1,74 ± 3,25	0,156
GUDCA	0,56 ± 0,53	0,3 ±0,59	0,375

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; DP, desvio padrão; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; e GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

Tabela 10 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e com DM2, do grupo COLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* período pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann- Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ± DP	T2 Média ± DP	T0 vs. T2 p valor
CA	1048,09 ± 1234,86	75,26 ± 156,61	**0,031**
CDCA	611,26 ± 697,42	87,1 ± 172,31	**0,031**
GCA	4,61 ± 5,03	0,58 ± 0,71	**0,031**
GCDCA	4,87 ± 4,38	0,48 ± 0,39	**0,031**
GUDCA	0,64 ± 0,54	0,09 ± 0,15	0,156

Legenda - T0, pré-operatório; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; e GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

Tabela 11 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres obesas e com DM2 do grupo COLE no período pós-operatório de 3 meses *versus* período pós-operatório de 12 meses de DGYR Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T1 Média ± DP	T2 Média ± DP	T1 vs. T2 p valor
CA	655,82 ± 1266,37	75,26 ± 156,61	0,063
CDCA	426,57 ± 841,43	87,1 ± 172,31	0,438
GCA	1,74 ± 3,25	0,58 ± 0,71	0,313
GCDCA	1,62 ± 2,72	0,48 ± 0,39	0,844
GUDCA	0,34 ± 0,64	0,09 ± 0,15	**0,031**

Legenda - T1, pós- operatório de 3 meses; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; e GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

6.4.3.3 Diferença no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes NOCOLE de acordo com o tempo

Nas pacientes NOCOLE, observamos maior número de alterações significativas entre os períodos pré e pós-operatórios. Ao todo, 11 ácidos biliares apresentaram diferenças significativas. Ao comparar o período pós-operatório de 3 meses com o pré-operatório, encontramos redução significativa nos ácidos biliares secundários desconjugados DCA (p=0,001) e LCA (p=0,005), ABs secundários conjugados à glicina GDCA (p=0,001) GLCA (p= 0,005), GUDCA (p=0,002), e conjugados à taurina TDCA (p=0), TLCA (p=0,001), TUDCA (p=0,021), conforme descrito na Tabela 12. A comparação entre o período pós operatório de 12 meses com o período pré-operatório mostrou 5 ABs significativamente reduzidos, dentre eles um AB primário conjugado, (TCA), e 4 AB secundários, DCA, GDCA, LCA e TDCA, como mostra a Tabela 13. Apenas o GDCA esteve significativamente reduzido quando comparamos o período pós-operatório de 3 meses com o período pós-operatório de 12 meses, como podemos observar na Tabela 14.

Tabela 12 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 3 meses *versus* pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	**T0** **Média ± DP**	**T1** **Média ± DP**	**T0 vs. T1** **p valor**
DCA	3105,38 ± 2734,88	804,34 ± 541,47	**0,001**
GCDCA	0,87 ± 0,64	0,51 ± 0,43	**0,017**
GDCA	2,92 ± 1,84	0,94 ± 0,61	**0,001**
GLCA	0,52 ± 0,41	0,21 ± 0,17	**0,005**
GUDCA	0,17 ± 0,09	0,07 ± 0,03	**0,002**
LCA	1318,22 ± 1165,16	472,71 ± 290,2	**0,005**
TCDCA	0,31 ± 0,42	0,19 ± 0,42	**0,033**
TDCA	1,67 ± 2,22	0,16 ± 0,34	**0,001**
TLCA	0,46 ± 0,59	0,07 ± 0,05	**0,001**
TUDCA	0,11 ± 0,13	0,04 ± 0,02	**0,021**
TCA	0,89 ±1,36	0,16 ± 0,33	0,168

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; DP, desvio padrão; DCA, ácido deoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; LCA, ácido litocólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico; TLCA, ácido tauroliticólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; e TCA, ácido taurocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[144].

Tabela 13 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* pré-operatório de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ± DP	T2 Média ± DP	T0 vs. T2 p valor
DCA	3105,38 ± 2734,88	1118,55 ± 977,14	**0,01**
GCDCA	0,87 ± 0,64	1,16 ± 2,62	0,08
GDCA	2,92 ± 1,84	1,76 ± 1,5	**0,046**
GLCA	0,52 ± 0,41	0,32 ± 0,19	0,082
GUDCA	0,17 ± 0,09	0,2 ± 0,43	0,057
LCA	1318,22 ± 1165,16	579,86 ± 294,66	**0,027**
TCDCA	0,31 ± 0,42	0,89 ± 2,78	0,305
TDCA	1,67 ± 2,22	0,3 ± 0,73	**0,021**
TLCA	0,46 ± 0,59	0,05 ± 0,04	**0,001**
TUDCA	0,11 ± 0,13	0,07 ± 0,09	0,168
TCA	0,89 ± 1,36	0,16 ± 0,33	**0,006**

Legenda - T0, pré-operatório; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; DCA, ácido deoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; LCA, ácido litocólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico; TLCA, ácido tauroliticólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; e TCA, ácido taurocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste *Mann-Withney* [144].

Tabela 14 - Níveis de ácidos biliares fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NOCOLE no período pós-operatório de 12 meses *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR. Teste de *Mann-Whitney*

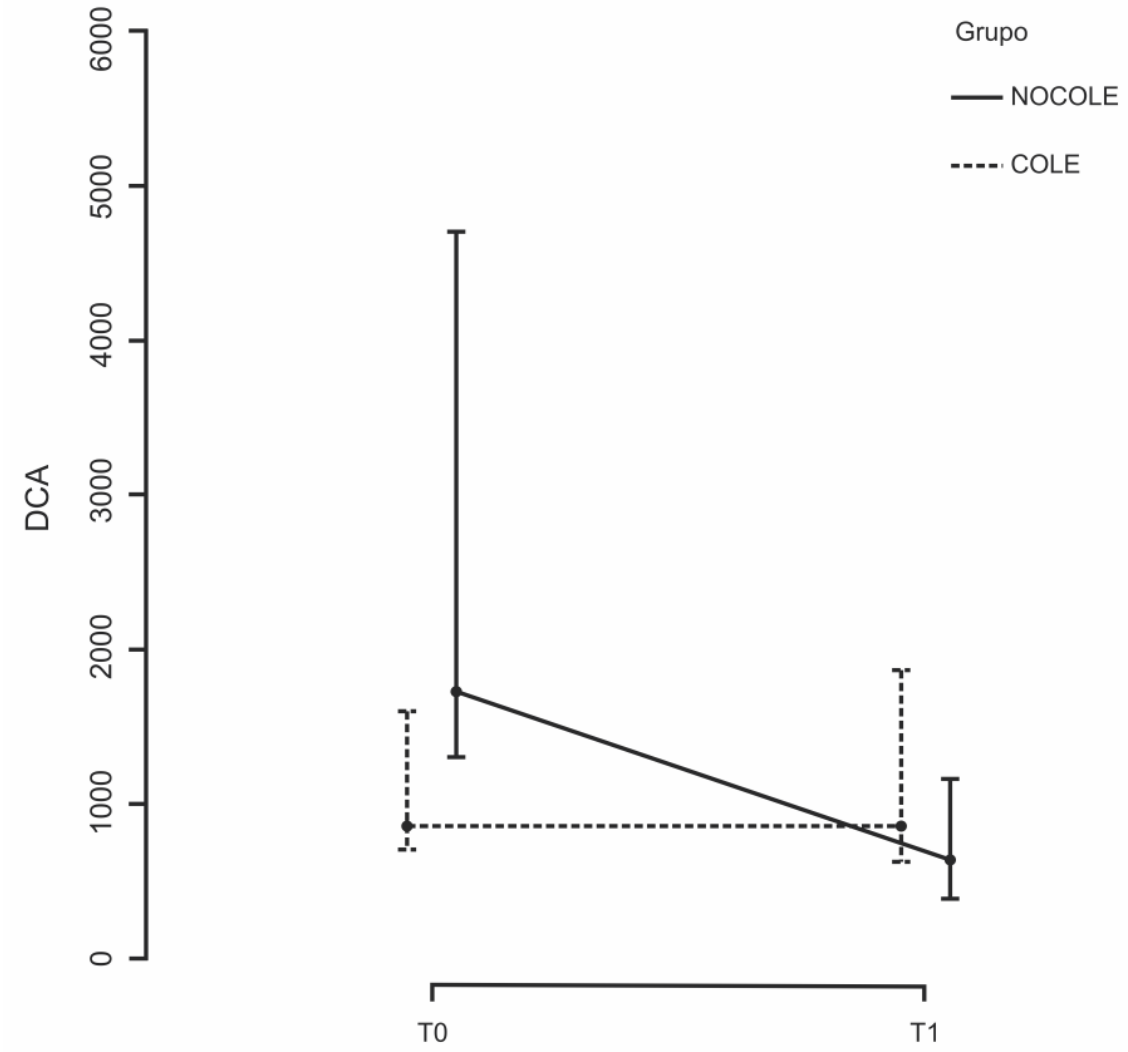
Ácidos biliares fecais	T1 Média ± DP	T2 Média ± DP	T1 vs. T2 p valor
DCA	804,34 ± 541,47	1118,55 ± 977,14	0,244
GCDCA	0,51 ± 0,43	1,16 ±2 ,62	0,787
GDCA	0,94 ± 0,61	1,76 ± 1,5	**0,027**
GLCA	0,21 ± 0,17	0,32 ± 0,19	0,155
GUDCA	0,07 ± 0,03	0,2 ± 0,43	0,34
LCA	472,71 ±290,2	579,86 ± 294,66	0,368
TCDCA	0,19 ± 0,42	0,89 ± 2,78	0,946
TDCA	0,16 ± 0,34	0,3 ± 0,73	0,497
TLCA	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,146
TUDCA	0,04 ± 0,02	0,07± 0,09	0,685
TCA	0,31 ± 0,59	0,16 ± 0,33	0,542

Legenda - T1, pós-operatório de 3 meses; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; DCA, ácido deoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; CDCA, ácido quenodeoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; LCA, ácido litocólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico; TLCA, ácido tauroliticólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; TCA, ácido taurocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste *Mann-Withney*[4]

6.4.3.4 Alterações no perfil de ácidos biliares fecais em pacientes COLE *versus* NOCOLE pelo teste ANOVA

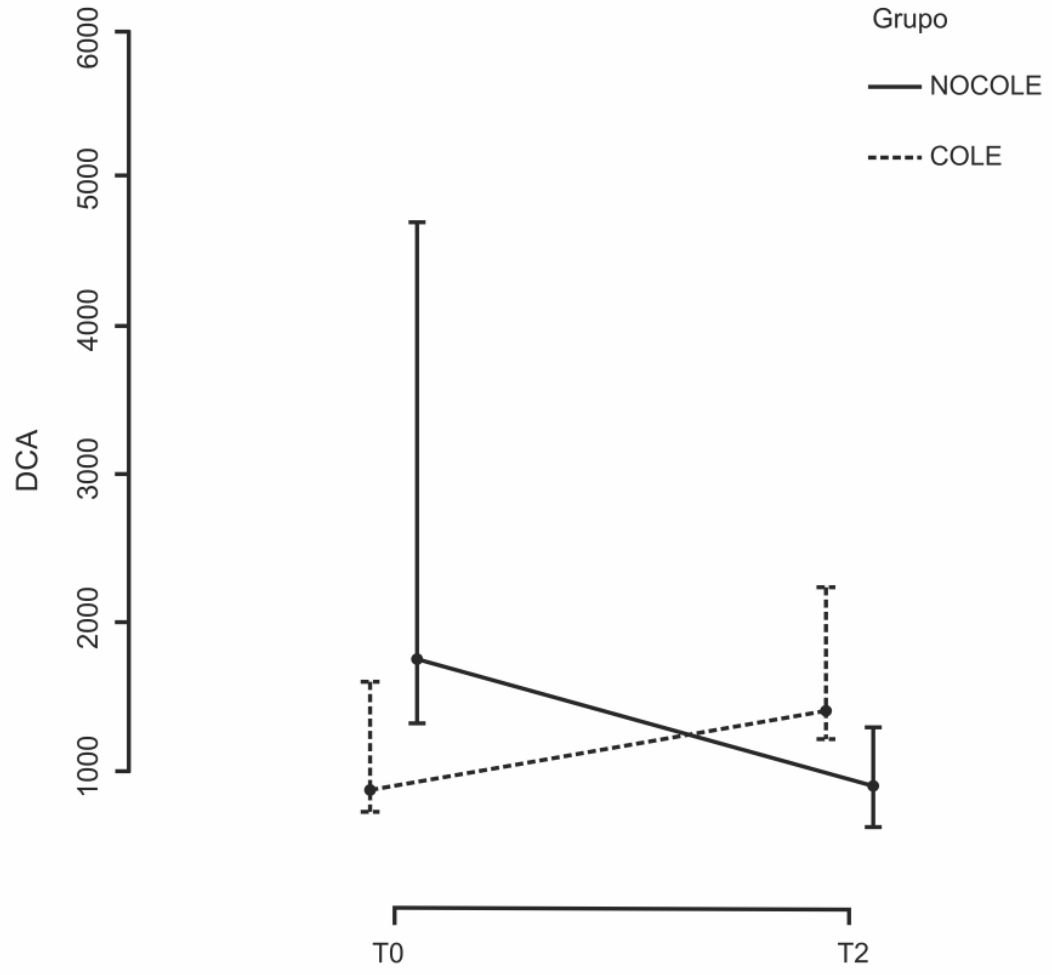
A comparação entre os grupos COLE e NOCOLE, por teste ANOVA, encontrou alterações nas taxas de ácido biliar primário conjugado (GCDCA) e nos ácidos biliares secundários DCA, GDCA, GLCA, TLCA e GUDCA após DGYR. Em comparação com o período pré-operatório, DCA diminuiu no grupo NOCOLE e aumentou em pacientes COLE no pós-operatório de 3 meses (p = 0,0056; Gráfico 06) e 12 meses (p = 0,047; Gráfico 07). Já GDCA reduziu no grupo NOCOLE apenas no período pós-operatório de 3 meses, enquanto apresentou leve redução no grupo COLE (p = 0,0359; Gráfico 08). Ainda sobre as alterações mais significativas entre o período pós-operatório de 3 meses *versus* período pré-operatório, encontramos o metabólito secundário conjugado à glicina (GLCA) reduzido em ambos os grupos, NOCOLE e COLE (p = 0,033; Gráfico 09). O ácido biliar TLCA reduziu no grupo NOCOLE no pós-operatório de 12 meses comparado com o período pré-operatório (p=0,0276; Gráfico 10), enquanto aumentou no grupo COLE no pós-operatório de 12 meses comparado com o pós-operatório de 3 meses (p = 0,05; Gráfico 11). Já GCDCA reduziu no grupo COLE apenas no período pós-operatório de 12 meses comparado com o pré-operatório (p=0,0084; Gráfico 12). Dentre as alterações encontradas entre os períodos pós-operatórios, encontramos uma, o ácido biliar GUDCA aumentado no grupo NOCOLE, e o oposto no grupo COLE (p = 0,0004; Gráfico 13).

Gráfico 6 - DCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



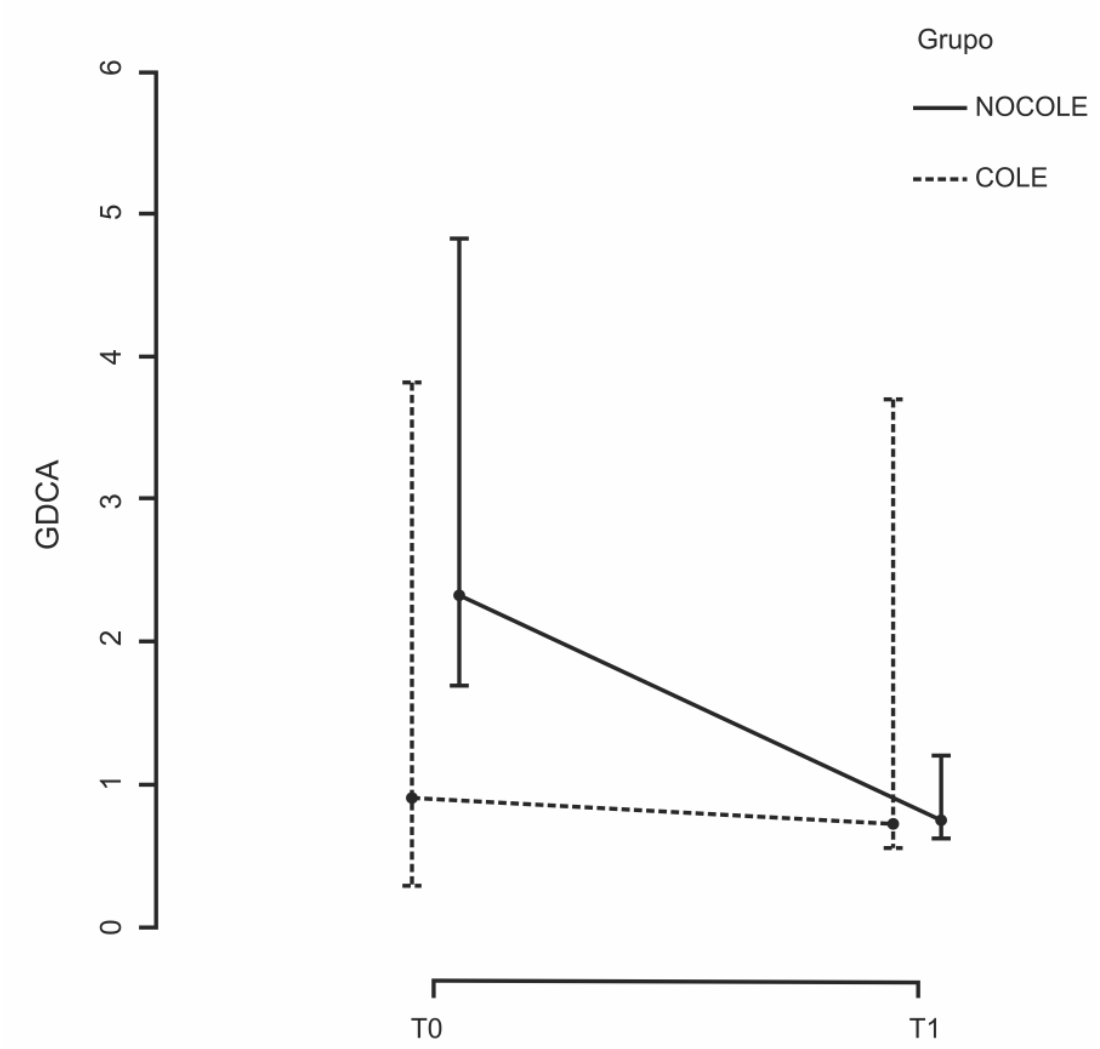
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T1 pós-operatório de 3 meses

Gráfico 7 - DCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



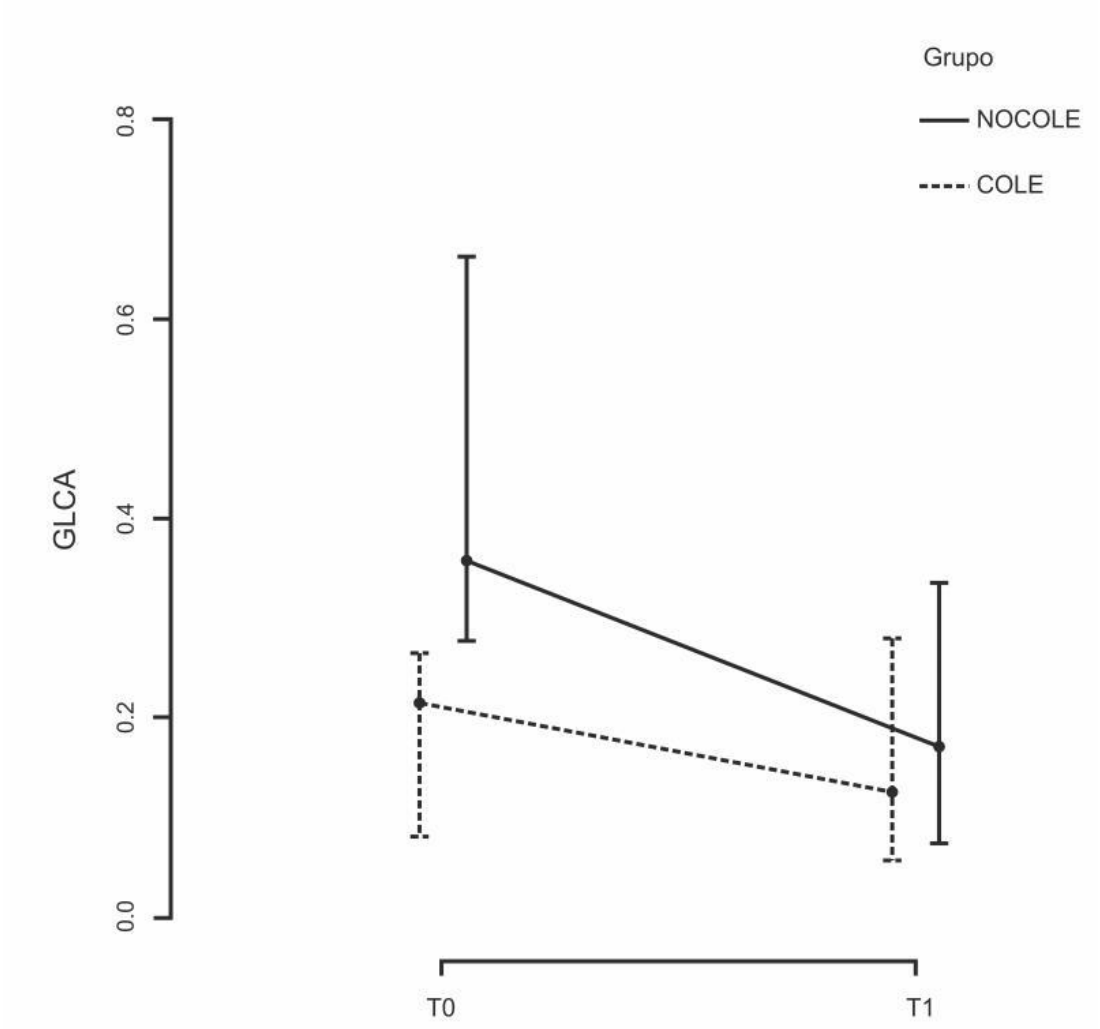
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T2 pós-operatório de 12 meses

Gráfico 8 - GDCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE.



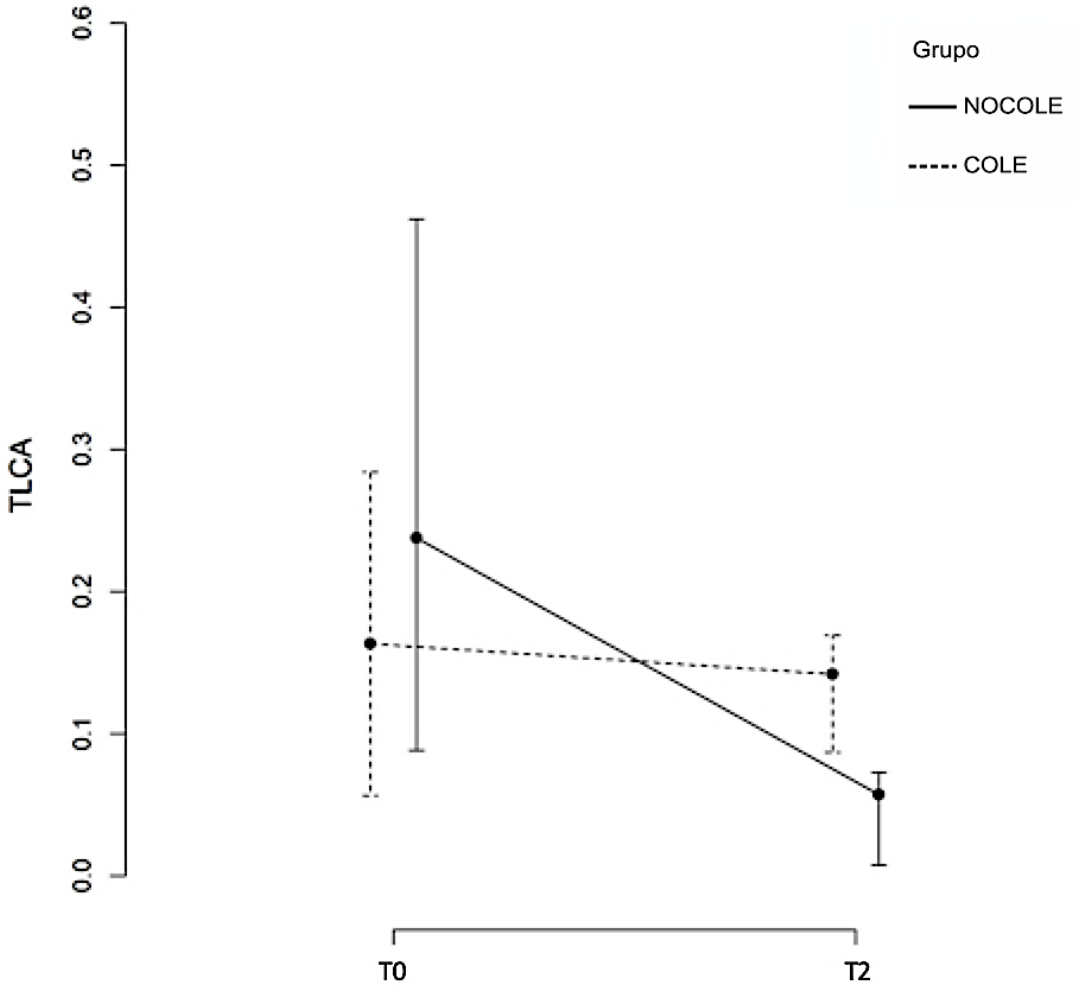
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T1 pós-operatório de 3 meses

Gráfico 9 - GLCA fecal entre o período pós-operatório de 3 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



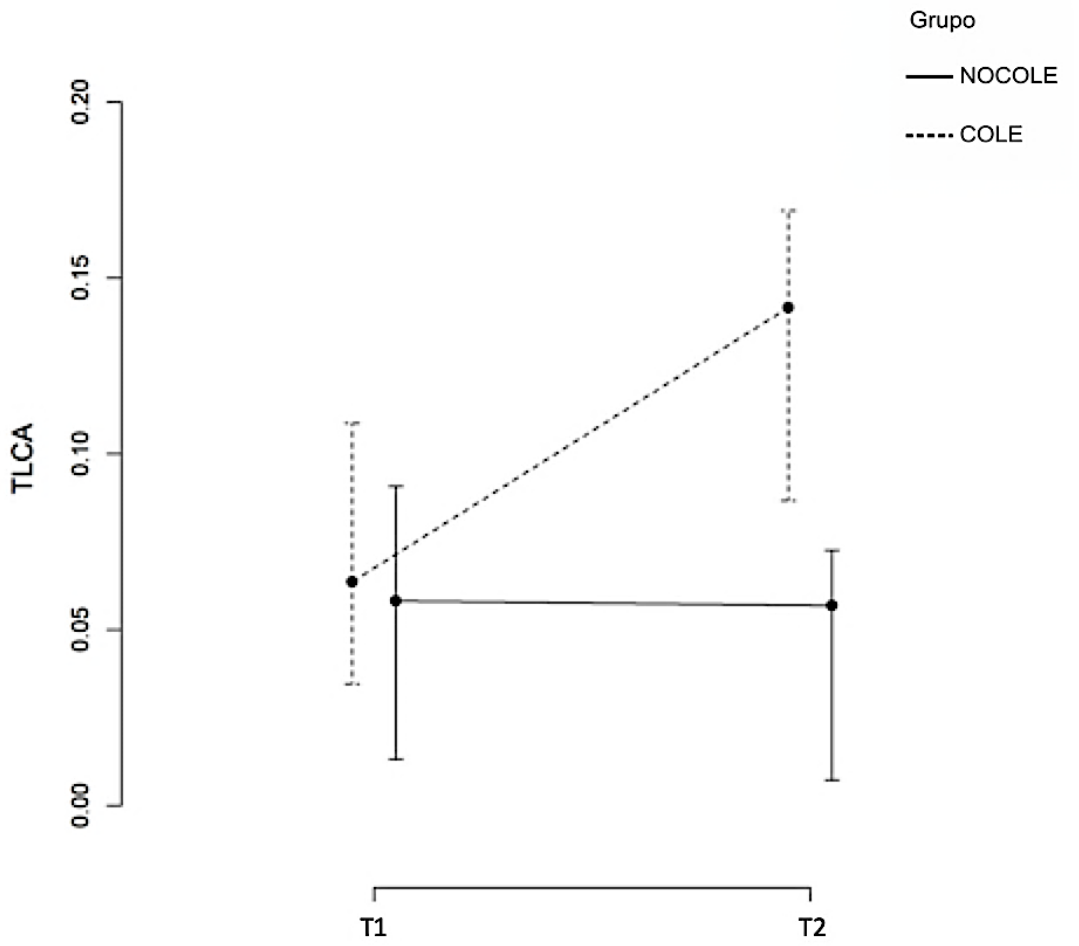
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T1 pós-operatório de 3 meses

Gráfico 10 - TLCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



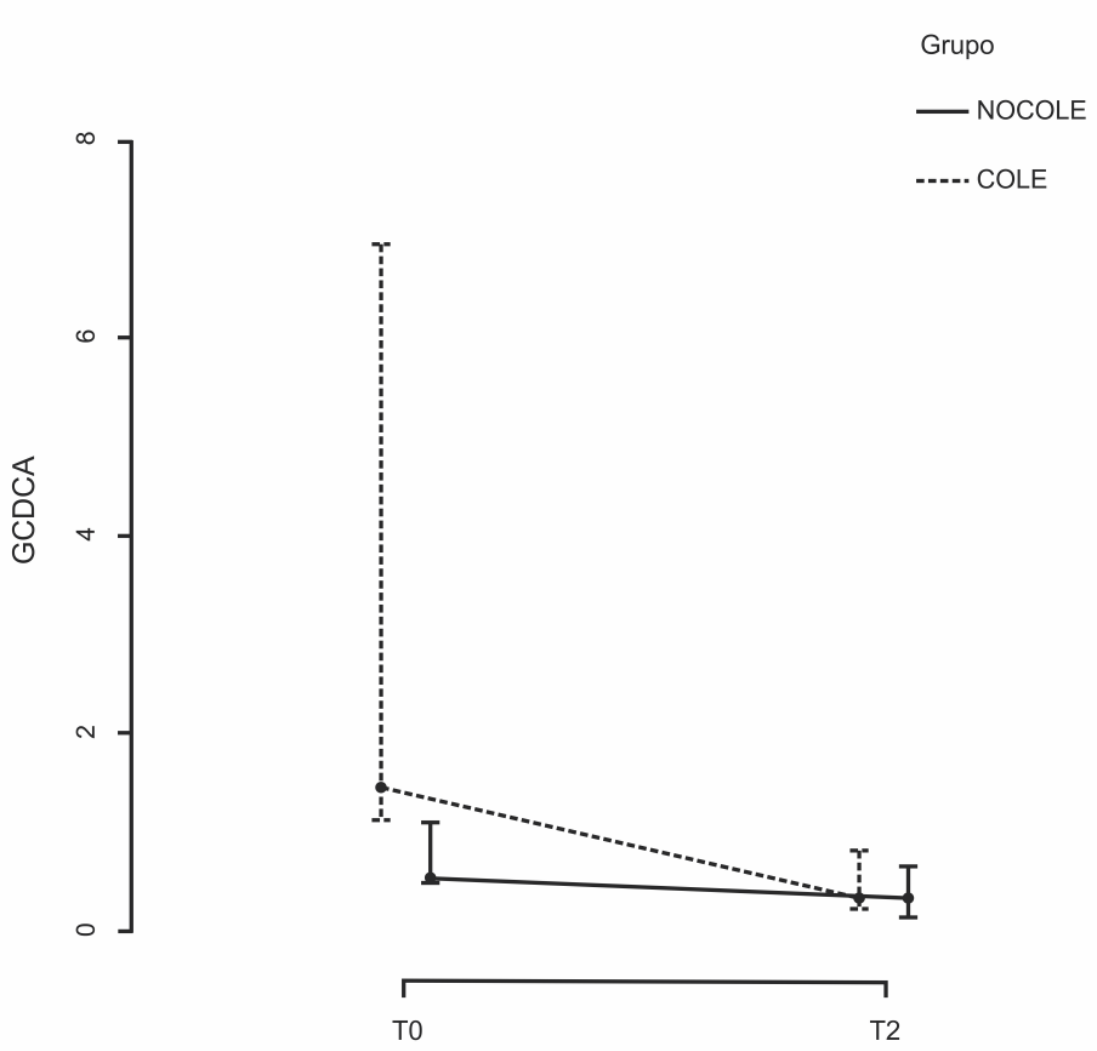
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T1 pós-operatório de 3 meses

Gráfico 11 - TLCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pós-operatório de 3 meses de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



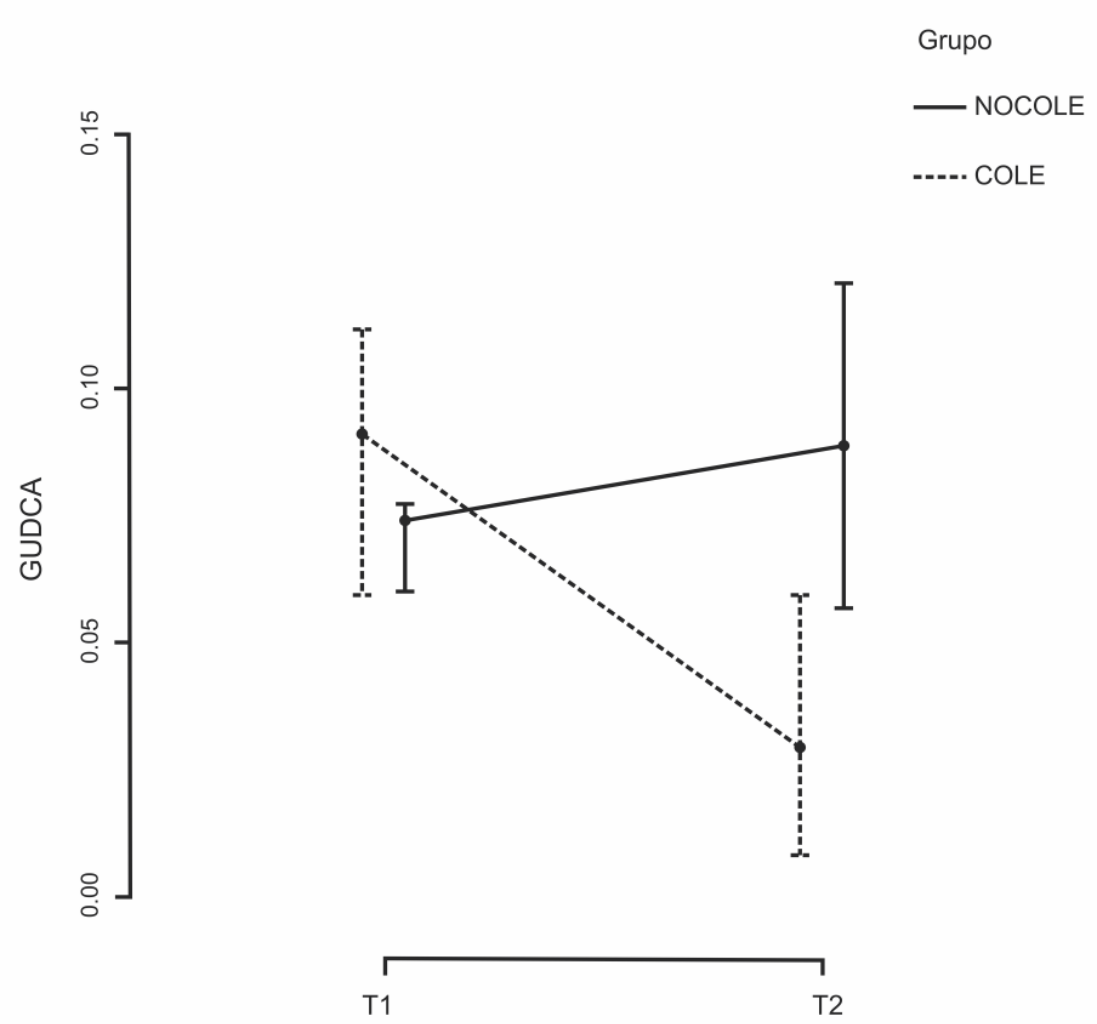
Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T2 pós-operatório de 12 meses

Gráfico 12 - GCDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pré-operatório de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T0 pré-operatório; T2 pós-operatório de 12 meses

Gráfico 13 - GUDCA fecal entre o período pós-operatório de 12 meses e o período pós-operatório de 3 meses) de DGYR entre os grupos NOCOLE e COLE



Legenda - COLE, colecistectomizadas; NOCOLE, não colescistectomizadas; T1 pós-operatório de 3 meses; T2 pós-operatório de 12 meses

Resumo dos resultados: o perfil de ABs fecais mostrou-se distinto entre as pacientes que foram submetidas à colecistectomia (COLE) e as pacientes do grupo que não realizou colecistectomia (NOCOLE). No período pré-operatório, o grupo COLE apresentou aumento significativo em 4 ABs fecais dos 14 avaliados. Diferença no perfil de AB fecais entre os grupos também foi observada nos períodos pós-operatórios. Ainda no grupo COLE, 2 ABs fecais estiveram aumentados no pós-operatório de 3 meses, e um AB fecal no pós-

operatório de 12 meses em relação ao período pré-operatório. Além disso, observamos aumento significativo da razão CA/CDCA no grupo COLE comparado com NOCOLE no pós-operatório de 12 meses. Ao analisar as mudanças intragrupo, de acordo com o tempo de DGYR, verificamos que em todos os períodos houve maior número de alterações significativas no grupo NOCOLE, com redução significativa nos níveis de ABs no período pós-operatório de 3 e 12 meses em relação ao período que antecedeu a DGYR.

6.4.4 Correlação entre ABs fecais e remissão do DM2 em pacientes NOCOLE

Das 20 pacientes estudadas, 7 (35%) foram submetidas à colecistectomia e, portanto, excluídas dessa análise. Nós incluímos 13 pacientes não colecistectomizadas e, dessas, 7 foram responsivas (R) enquanto 6 pacientes foram não responsivas (NR) de acordo com os critérios da ADA. As amostras fecais das 13 pacientes foram avaliadas nos períodos pré (T0) e pós-operatórios de 3 (T1) e 12 (T2) meses. A Figura 17 mostra o fluxograma das amostras fecais de pacientes não colecistectomizadas analisadas nos períodos T0, T1 e T2, dos grupos de remissão do DM2.

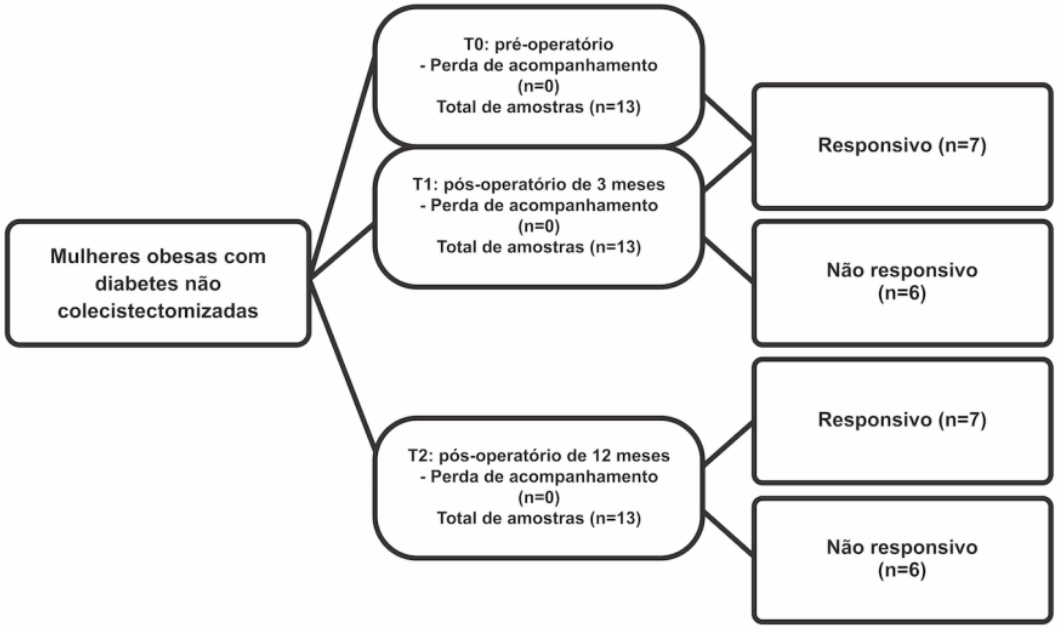


Figura 17 - Diagrama Consort das amostras fecais de pacientes NOCOLE classificadas como R e NR nos períodos estudados

6.4.4.1 Perfil de ácidos biliares à DGYR, de acordo com remissão pós-operatória de DM2 em pacientes NOCOLE

A comparação de ABs fecais entre os grupos R e NR de 13 pacientes que não realizaram colecistectomia foi feita por meio do teste estatístico *Mann-Withney*[4] e *Wilcoxon*, considerando-se nível de significância de 5% e utilizando-se o software R (versão 3.2.2). Ao compararmos os grupos R (n=7) e NR (n=6) em todos períodos da DGYR, observamos que apenas o AB primário conjugado à glicina (GCA) foi significativamente diferente entre os grupos e somente no período pré-operatório à DGYR, quando mostrou-se reduzido no grupo R (p= 0,022). Além disso, verificamos tendência de aumento na razão CA/CDCA no grupo R no período do pós-operatório de 3 meses (p=0,073) comparado com o grupo NR, de acordo com o teste *Mann-Withney*, conforme mostramos na Tabela 15 e no Gráfico 14.

Tabela 15 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 entre os grupos R e NR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	**NR (n=6) T0 Média ± DP**	**R (n=7) T0 Média ± DP**	**P valor T0**	**NR (n=6) T1 Média ± DP**	**R (n=7) T1 Média ± DP**	**P valor T1**	**NR (n=6) T2 Média ± DP**	**R (n=7) T2 Média ± DP**	**P valor T2**
GCA	1,05 ± 0.60	0,6 ± 0.32	**0,022**	0,43 ± 0.71	688,41 ± 1159,25	0,835	0,87 ± 1.28	0,33 ± 0.30	0,365
CA/ CDCA	1,35 ± 1.06	1,67 ± 0.95	0,533	1,09 ± 0,95	3,56 ± 2,52	0,073	4,52 ± 6.79	2,73 ± 5.13	0,365

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; T2, pós- operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; GCA, ácido glicocólico; razão CA/CDCA (ácido cólico/ácido quenodeoxicólico). Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

6.4.4.2 Diferença no perfil de ABs fecais em pacientes NR NOCOLE de acordo com o tempo após a DGYR

NR no período pré-operatório versus pós-operatório de 3 meses

No grupo NR, 4 ABs estiveram significativamente reduzidos no período pré-operatório comparado com o pós-operatório de 3 meses, sendo AB primários e secundários, todos conjugados à glicina (GCDCA (p=0,031), GDCA (p=0,031), GLCA (p=0,031) e GUDCA (p=0,031). Os AB fecais DCA (p= 0,062), TDCA (p= 0,062) e TCDCA (p= 0,062) também estiveram reduzidos no grupo NR, sem significado estatístico (Tabela 16).

Tabela 16 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ± DP	T1 Média ± DP	T0 vs. T1 p valor
GCDCA	1,21 ± 0,80	0,56 ± 0,35	**0,031**
GDCA	2,82 ± 1,70	0,90± 0,73	**0,031**
GLCA	0,46 ± 0,34	0,18± 0,23	**0,031**
GUDCA	0,21± 0,06	0,07 ± 0,04	**0,031**
DCA	2885,33 ± 3066,21	849,33 ± 659,78	0,062
TCDCA	0,36. ± 0,36	0,13 ± 0,24	0,062
TDCA	2,10 ± 2,96	0,11 ± 0,17	0,062

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; DP, desvio padrão; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; GDCA, ácido glicoodeoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; GUDCA, ácido glicoursodeoxicólico; DCA, ácido deoxicólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

NR no período pré-operatório versus pós-operatório de 12 meses

Para pacientes do grupo NR, ao se comparar o período pós-operatório de 12 meses com o período pré-operatório, encontraram-se níveis fecais diminuídos de TLCA (p=0,031) e TCA (p= 0,062) (Tabela 17).

Tabela 17 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	**T0** **Média ± DP**	**T2** **Média ± DP**	**T0 vs. T2** **p valor**
TLCA	0,63 ± 0,84	0,05 ± 0,05	**0,031**
TCA	0,97 ± 1,38	0,29 ± 0,47	0,062

Legenda - T0, pré-operatório; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; TLCA, ácido taurolitocólico; TCA, ácido taurocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[144]

NR no período pós-operatório de 3 meses versus pós-operatório de 12 meses

Nenhuma alteração significativa foi encontrada nesse grupo entre os períodos pós-operatórios.

6.4.4.3 Diferença no perfil de AB fecais em pacientes R em pacientes NOCOLE de acordo com o tempo

R no período pré-operatório versus pós-operatório de 3 meses

Para pacientes do grupo R, ao se comparar o período pós-operatório de 3 meses com o período pré-operatório, encontraram-se níveis fecais diminuídos de DCA (p=0,015), GDCA (p=0,015), LCA (p=0,031), TDCA (p=0,015), TLCA (p=0,015), TUDCA (p=0,031) e GLCA (0,078), e aumento de CA/CDCA (p=0,046) (Tabela 18).

Tabela 18 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ± DP	T1 Média ± DP	T0 vs. T1 p valor
DCA	3294,0 ± 2652,26	765,77 ± 468,9	**0,015**
GDCA	3,01 ± 2,08	0,47± 0,52	**0,015**
LCA	1308,0 ± 993,73	488,51 ± 233,5	**0,031**
TDCA	1,31± 1,48	0,21 ± 0,45	**0,015**
TLCA	0,31 ± 0,24	0,08 ± 0,05	**0,015**
TUDCA	0,08. ± 0,03	0,04 ± 0,01	**0,031**
CA/CDCA	1,67 ± 0,95	3,56 ± 2,52	**0,046**
GLCA	0,58 ±0,48	0,24 ± 0,11	0,078

Legenda - T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; DP, desvio padrão; DCA, ácido deoxicólico; GDCA, ácido glicoodeoxicólico; LCA, ácido litocólico; TDCA, ácido taurodeoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; razão CA/CDCA (ácido cólico/ácido quenodeoxicólico); GLCA, ácido glicolitocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[4]

R no período pré-operatório versus pós-operatório de 12 meses

Para pacientes do grupo R, ao se comparar o período pós-operatório de 12 meses com o período pré-operatório, encontraram-se níveis fecais diminuídos em 5 ABs, dentre eles DCA (p=0,015), GDCA (p=0,015), LCA (p=0,015), TLCA (p=0,015) e TUDCA (p=0,031). E 4 ABs apresentaram tendência, dentre eles TCA (p= 0,078), GCDCA (p= 0,078), TCDCA (p= 0,078) e TDCA (p= 0,078). (Tabela 19).

Tabela 19 - Níveis de AB fecais, expressos em pmol/mg, em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR nas pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T0 Média ± DP	T2 Média ± DP	T0 vs. T2 p valor
DCA	3294,0 ± 2652,26	1231,43 ± 468,9	**0,015**
GDCA	3,01 ± 2,08	0,35± 0,24	**0,015**
LCA	1308,0 ± 993,73	633,43 ± 267,74	**0,015**
TCA	0,82± 1,45	0,06 ± 0,06	0,078
TLCA	0,31 ± 0,24	0,04 ± 0,04	**0,015**
TUDCA	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,02	**0,031**
GCDCA	0,58 ± 0,25	0,35 ± 0,24	0,078
TCDCA	0,26 ± 0,49	0,01 ± 0,01	0,078
TDCA	1,3 ± 1,48	0,08 ± 0,08	0,078

Legenda - T0, pré-operatório; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; DCA, ácido deoxicólico; GDCA, ácido glicoodeoxicólico; LCA, ácido litocólico; TCA, ácido taurocólico; TLCA, ácido taurolitocólico; TUDCA, ácido tauroursodeoxicólico; GCDCA, ácido glicoquenodeoxicólico; TCDCA, ácido tauroquenodeoxicólico e TDCA, ácido taurodeoxicólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[144]

R no período pós-operatório de 3 meses versus pós-operatório de 12 meses

Para pacientes do grupo R, ao se comparar o período pós-operatório de 12 meses com o período pós-operatório de 3 meses, encontraram-se níveis fecais aumentados de GDCA (p= 0,046) e TCA (p=0,078) (Tabela 20).

Tabela 20 - Níveis de AB fecais em mulheres com obesidade e DM2 no grupo R no período pós-operatório de 3 meses *versus* pós-operatório de 12 meses de DGYR em pacientes NOCOLE. Teste de *Mann-Whitney*

Ácidos biliares fecais	T1 Média ± DP	T2 Média ± DP	T1 vs. T2 p valor
GDCA	0,98 ± 0,54	1,41 ± 0,45	0,046
TCA	0,39 ± 0,73	0,06 ± 0,06	0,078

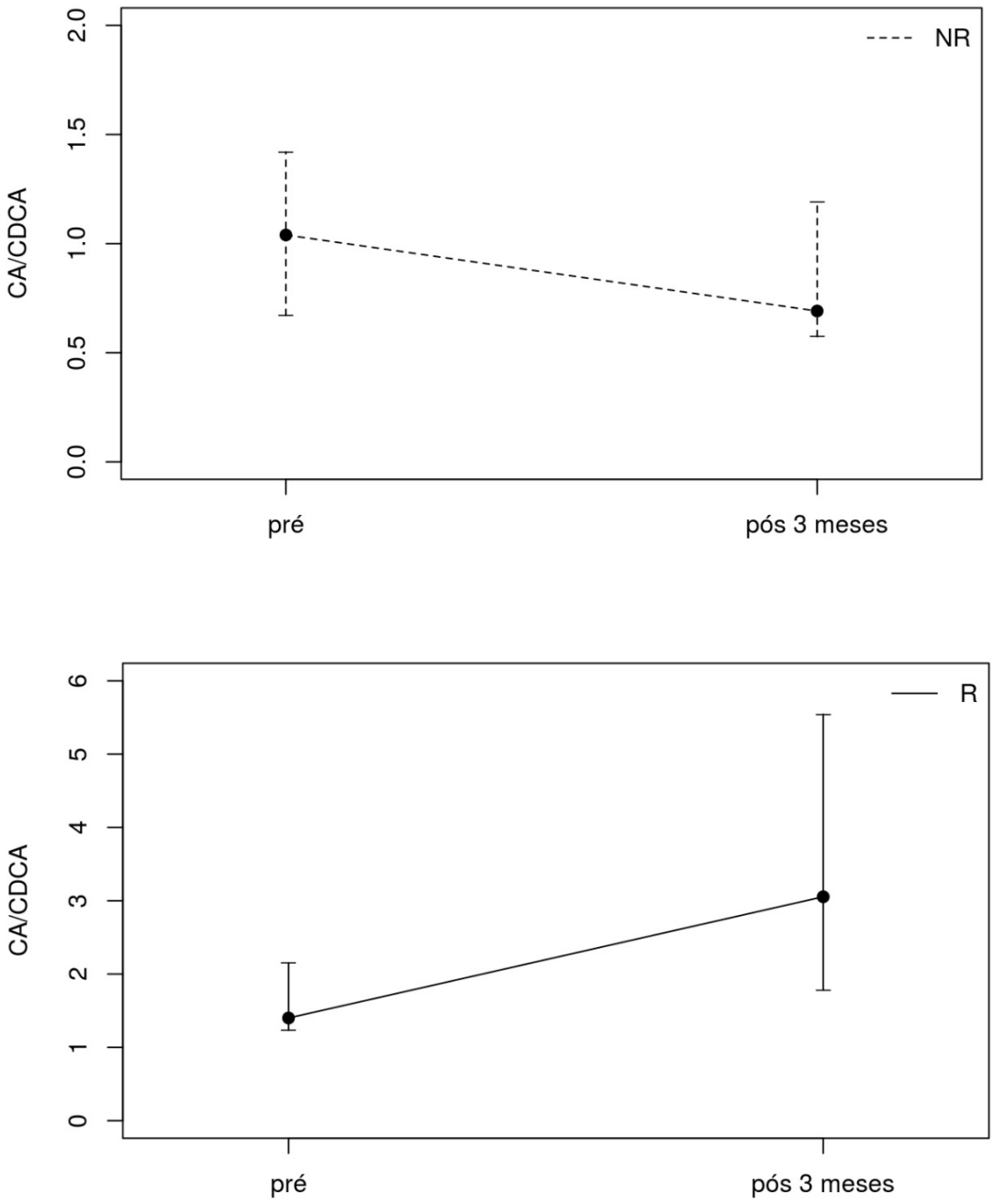
Legenda - T0, pré-operatório; T2, pós-operatório de 12 meses; DP, desvio padrão; TLCA, ácido taurolitocólico; TCA, ácido taurocólico. Valores em negrito têm significância estatística de acordo com o teste de *Mann-Withney*[144]

CA/CDCA entre os grupos R e NR nos períodos pós-operatórios de DGYR em pacientes NOCOLE de acordo com o teste de Wilcoxon.

No grupo NR, a razão CA/CDCA não apresentou diferença significativa entre o período pós-operatório de 3 meses (p= 0,68) comparado com o período pré-operatório.

No grupo R, a razão CA/CDCA apresentou aumento significativo no período pós-operatório de 3 meses (p=0,046) quando comparada aos valores do pré-operatório, como mostra o Gráfico 14. Já no pós-operatório de 12 meses, não observamos alterações significativas no grupo R (p=0,68) e no grupo NR (p=0,21) quando comparados com o período pré-operatório.

Gráfico 14 - CA/CDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon*

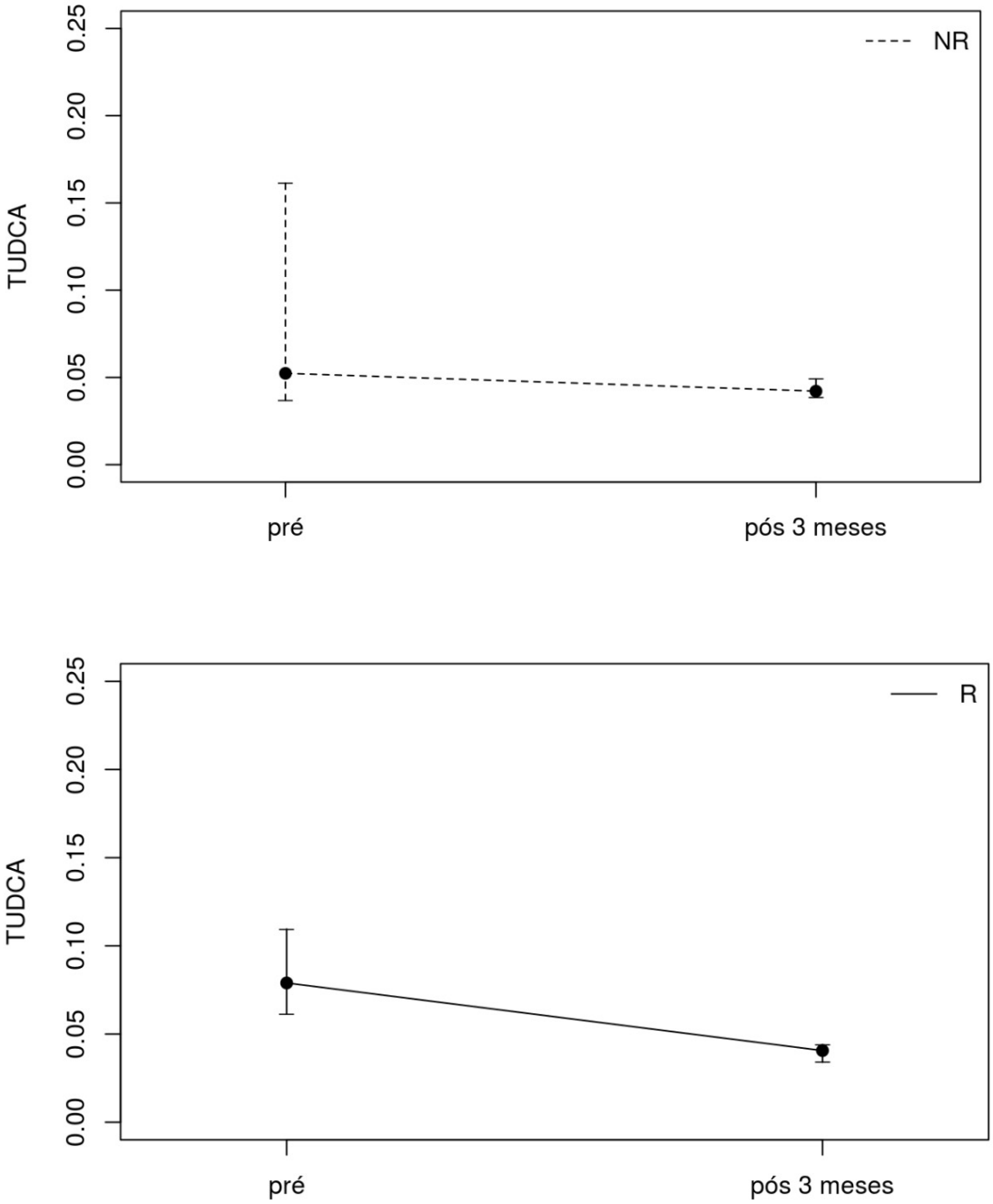


Legenda - CA/CDCA razão entre ácido cólico e ácido quenodeoxicólico; NR não responsivo; R responsivo; pré: pré-operatório; pós 3 meses: pós-operatório de 3 meses

TUDCA entre os grupos R e NR nos períodos pós-operatórios de DGYR em pacientes NOCOLE

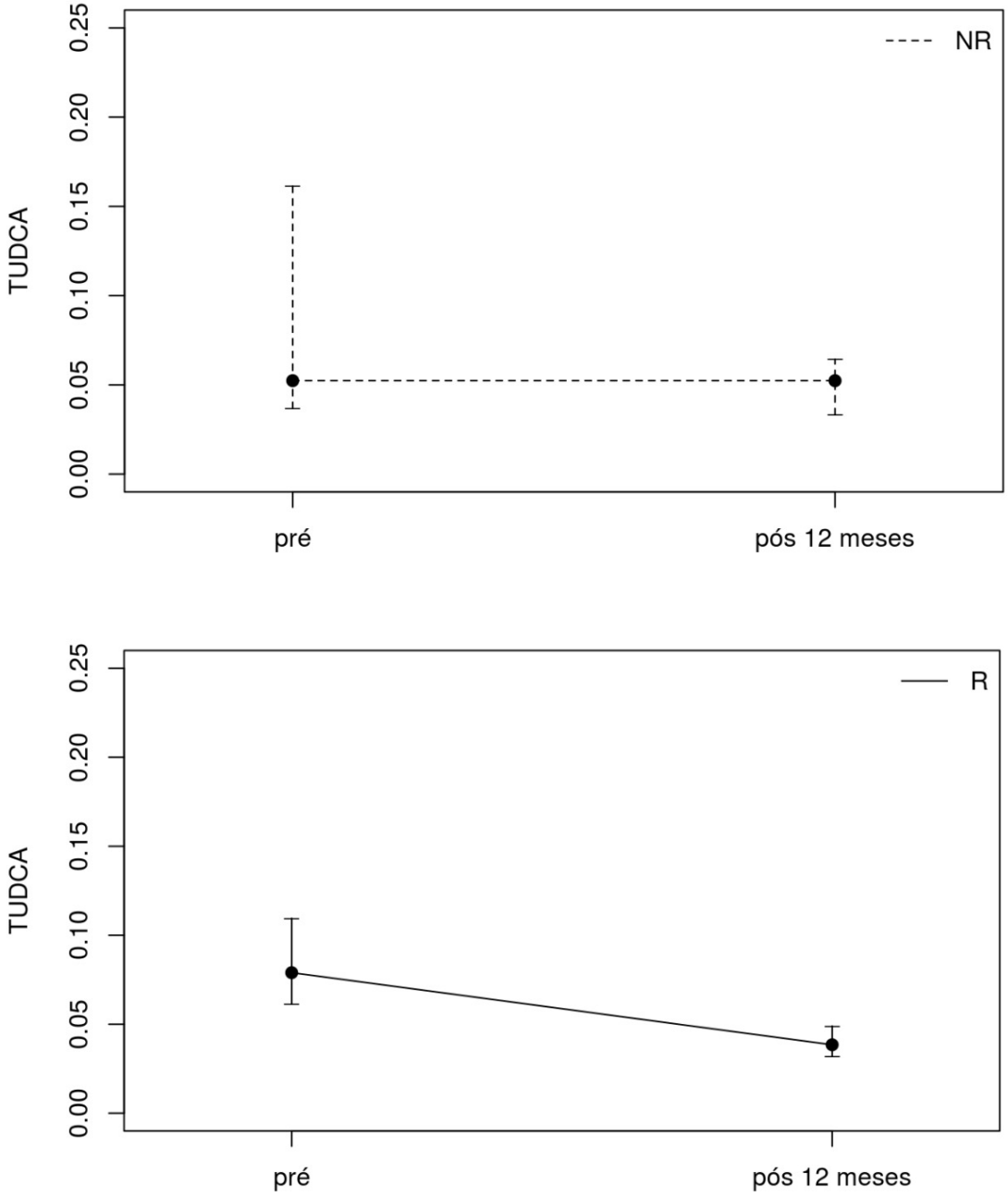
Houve redução dos níveis de TUDCA no grupo R em ambos os períodos, pós-operatórios de 3 meses (p=0,031) e 12 meses (0,015), em relação ao período pré-operatório. Esses achados foram distintos dos encontrados para níveis desse metabólito no grupo NR nos períodos pós-operatório de 3 (p=0,56) e 12 meses (p=0,84) quando comparados com o pré-operatório (gráfico 15A e 15B).

Gráfico 15A - TUDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 3 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon*



Legenda - TUDCA ácido tauroursodeoxicólico; NR não responsivo; R responsivo; pré: pré-operatório; pós 3 meses: pós-operatório de 3 meses

Gráfico 15B - TUDCA nos grupos R e NR no período pré-operatório *versus* pós-operatório de 12 meses em pacientes NOCOLE. Teste de *Wilcoxon*



Legenda - TUDCA ácido tauroursodeoxicólico; NR não responsivo; R responsivo; pré: pré-operatório; pós 3 meses: pós-operatório de 12 meses

Resumo dos resultados: A comparação entre o perfil metabolômico fecal de pacientes R e NR que não realizaram colecistectomia apontou diferenças entre os grupos, com alteração significativa de GCA no período que antecedeu à cirurgia, o qual foi significativamente menor no grupo R, e tendência significativa para a razão CA/CDCA, que foi maior no grupo R. No que se refere às observações intragrupo, verificamos maior número de alterações significativas também no grupo R em todos os períodos estudados. O ácido biliar TUDCA apresentou redução significativa no grupo R no pós-operatório de 3 e 12 meses comparado com o período pré-operatório.

6.5 Resumo dos principais achados

A DGYR se mostrou eficaz em promover perda significativa de peso e melhora de todos os parâmetros antropométricos avaliados. Houve redução do consumo calórico, bem como de macronutrientes após a cirurgia bariátrica, independentemente do método de avaliação (R7d ou R24h). Os níveis de glicemia, insulina e hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) foram significativamente menores no grupo R. Em estudo-piloto (n=10), observou-se alteração do perfil metabolômico fecal *untargeted* após a DGYR. A análise metabolômica *targeted* (n=20) confirmou a alteração no perfil metabólico fecal após a DGYR e apontou redução significativa de 10 ABs fecais. Houve remissão total de DM2 em 12 pacientes (grupo R) após a DGYR. O AB TUDCA associou-se com a remissão pós-operatória do DM2 no período do pós-operatório de 3 meses e a razão CA/CDCA no período pós-operatório de 12 meses da cirurgia. O perfil de ABs fecais mostrou-se distinto entre pacientes colecistectomizadas (COLE) e não colecistectomizadas (NOCOLE). O grupo COLE apresentou aumento significativo em alguns ABs fecais, também comparado com o grupo NOCOLE, inclusive na razão CA/CDCA no pós-operatório de 12 meses. Ao analisarmos mudanças intragrupo de acordo com o tempo de DGYR, verificamos que, em todos os períodos, um maior número

de alterações significativas aconteceu no grupo NOCOLE. Por fim, na comparação entre o perfil metabolômico fecal de pacientes R e NR NOCOLE (n=13), observamos diferença significativa entre os grupos no pré-operatório no grupo R, envolvendo GCA. No que se refere às observações intragrupo, encontramos maior número de alterações significativas também no grupo R. A razão CA/CDCA apresentou aumento significativo no grupo R no período pós-operatório de 3 meses comparado com o pré-operatório, e o metabólito TUDCA apresentou redução significativa no grupo R no pós-operatório de 3 e 12 meses comparado com o período pré-operatório.

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1 Da contribuição científica e seus pontos fortes

DGYR proporciona, na maior parte das vezes em que é praticada, perda de peso significativa e sustentada, geralmente acompanhada por efeitos metabólicos precoces que podem culminar em controle glicêmico e remissão do DM2 [37, 141,142].

Metabólitos, especialmente ácidos biliares, atualmente são reconhecidos como potentes moléculas de sinalização implicadas em respostas fisiológicas pleiotrópicas, as quais podem incluir metabolismo energético e homeostase glicêmica por meio de ligação com receptores específicos. A DGYR, ao modificar a fisiologia anatômica, faz com que a bile adentre o trato gastrintestinal (TGI) superior via alça biliopancreática da DGYR, o que pode favorecer, após reabsorção entero-hepática, o aumento de níveis séricos de ABs primários e secundários em modelos experimentais e em humanos [116-118]. Níveis aumentados de ABs circulantes, após a DGYR, mostram ser agentes, em potencial, de benefícios metabólicos cirúrgicos, com particular ação na regulação do metabolismo de glicose [113, 116-118, 143-145]. Entretanto, dados sobre uma possível relação entre aumento de ABs sistêmicos e homeostase glicêmica após a DGYR ainda são controversos. Em pacientes não diabéticos submetidos à DGYR, Patti et al. encontraram aumento significativo na concentração sérica de AB total, que esteve relacionado com a melhora em marcadores do metabolismo glicídico e lipídico [113]. Kohli R et al. (2013) verificaram, em pacientes não diabéticos submetidos à DGYR e com 20% de perda de peso, aumento de mais de duas vezes da concentração de ABs plasmáticos. No entanto, essa elevação não foi preditor significativo de alterações na homeostase glicêmica ou no metabolismo energético nesses pacientes [116].

O perfil e a concentração de ácidos biliares fecais podem refletir o conjunto de interações entre hospedeiro, saúde do TGI, eficiência digestiva e composição da microbiota intestinal [146- 148]. Estudos do perfil de ABs fecais após a DGYR são muito escassos e apenas experimentais [24, 119, 149]. Em modelos animais, observou-se redução de ABs fecais após a DGYR, que, segundo os autores, poderia estar implicada na melhora da homeostase glicêmica e na remissão do DM2 [24]. Nesse sentido, o presente estudo clínico é pioneiro por vários motivos. Trata-se de estudo clínico da metabolômica fecal *untargeted e targeted*, que particularizou a investigação sobre ácidos biliares em períodos de 3 e 12 meses após DGYR e buscou associações entre as modificações de AB fecais e a remissão da DM2. Com isso, logrou permitir melhor entendimento sobre alteração do perfil de ABs fecais após a DGYR e sua influência na remissão de DM2. Adiciona-se que avaliamos, pela primeira vez, o impacto da colecistectomia no perfil metabolômico de ABs fecais antes e após a DGYR.

7.2 Do método

O nosso primeiro desafio metodológico deu-se ao escolher a técnica analítica para análise das amostras fecais. A metabolômica utiliza cinco técnicas analíticas para análise dos metabólitos [150]. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM) são os métodos mais usados na detecção e análise de metabólitos. A RMN é muito útil na caracterização estrutural de compostos desconhecidos e tem sido muito empregada na análise do metaboloma. No entanto, em algumas circunstâncias, o espectro de RMN da região do hidrogênio (^{1}H) não fornece informações suficientes para a caracterização completa de um metabólito, principalmente quando o composto é deficiente em prótons [5, 57, 151, 152]. Já a espectrometria de massas (EM) apresenta várias vantagens em relação aos outros métodos de análise química. Dentre elas estão a sua alta sensibilidade e praticidade, combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade dos

componentes presentes em amostras biológicas complexas, e a possibilidade de detecção e identificação de compostos desconhecidos. Além disso, a combinação da espectrometria de massas com técnicas de separação analítica, como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (CL), permite ampliar ainda mais a capacidade de análise química [151,153]. O espectro exibe a massa de moléculas ionizadas e seus fragmentos correspondentes, e os valores das massas são a soma das massas dos átomos que compõem cada fragmento ou molécula [151.] No presente estudo, optou-se pelo emprego do método de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (EM-CL), o que reduz a complexidade do espectro de massa, o efeito matriz, e permite a detecção de diferentes tipos de metabólitos [76, 153].

O nosso segundo desafio foi avaliar a ocorrência de diferenças no perfil metabolômico fecal das pacientes estudadas antes e após a DGYR. Nessa fase, primeiramente optamos por realizar uma análise metabolômica fecal *untargeted* das 10 primeiras pacientes incluídas no estudo. Avaliamos as amostras fecais dessas mulheres nos 3 períodos distintos da DGYR (pré-operatório e pós-operatório de 3 e 12 meses), utilizando como solvente o metanol para extração das amostras e um equipamento de EM-CL. Os íons com maior pontuação para a separação dos 3 períodos foram identificados [133, 154], e conseguimos observar diferença no perfil de metabólitos fecais entre os períodos pré e pós-operatórios. Foram escolhidos 15 metabólitos VIPs no modo positivo e negativo, que foram submetidos à espectrometria de massas em tandem (MS-MS). A seguir, eles foram comparados com uma biblioteca de metabólitos. A identificação de metabólitos é realizada utilizando-se bibliotecas de espectros construídas no próprio laboratório de análise, ou pelo uso de bibliotecas comerciais, como a NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*). Buscas em bases de dados públicas on-line, como HMDB, Metlin e MassBank, também são realizadas para a determinação putativa dos metabólitos [155]. Contudo, não nos foi permitido identificar os metabólitos pela ausência de informação adequada na biblioteca específica em 2016.

Ao verificarmos que existiu diferença no perfil metabolômico fecal entre os diferentes períodos que envolveram a DGYR, partimos para uma análise metabolômica fecal *targeted,* com o intuito de avaliar especificamente o papel dos ácidos biliares em nossa amostra completa (n=20) e também verificar o seu papel na remissão pós-operatória do DM2, a qual envolveu a divisão das amostras em pacientes responsivas (R = 12) e não responsivas (NR = 8). Para tal, foi utilizado um kit específico para quantificação de ácidos biliares desenvolvido pela Biocrates®. Se, por um lado, os estudos com metabolômica *untargeted* podem ser usados para gerar novas hipóteses para testes posteriores, já que analisam a abundância de íons de grande número de metabólitos desconhecidos, as abordagens *target* focam na quantificação dos níveis de metabólitos já conhecidos para detectar diferenças entre grupos biológicos distintos [156].

Após a análise das amostras por meio das análises metabolômicas *untarget* e *target*, os dados obtidos foram convertidos em informações interpretáveis. Para esse propósito, têm sido desenvolvidos modelos matemáticos específicos. No presente estudo, foram aplicados diferentes métodos estatísticos que incluíram análises univariadas (ANOVA, *Mann-Whitney*, *Wilcoxon*, teste t e *Fold change*) e multivariadas *(*PLS-Da).

No objetivo de obter amostras mais homogêneas possíveis, optamos por avaliar apenas mulheres. Já foi visto que o fenótipo metabólico designa característica individual e pode ser determinado basicamente a partir da associação entre a variação genética e outros fatores relevantes que interferem na condição biológica. Esse perfil pode ser influenciado por gênero e idade [157]. Estudos destacam o efeito do sexo nas alterações metabolômicas [156].

7.3 Dos resultados

7.3.1 Resposta clínica da amostra

Clinicamente, nos períodos de 3 e 12 meses após a DGYR, as pacientes apresentaram melhora do grau de obesidade, refletida pela diminuição significativa de peso e IMC. A modificação antropométrica ocorreu de forma semelhante à anteriormente reportada na literatura [18, 46, 158-161]. No que se refere ao consumo alimentar, todos os macronutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) e calorias apontaram redução significativa aos 3 meses da DGYR, com ambos os métodos utilizados para a avaliação (R7d e R24h) do consumo alimentar. Nosso achado é coerente com os encontrados na literatura pertinente [160, 162-164]. Ao compararmos os grupos R e NR nos períodos pré e pós-operatório de 3 meses, não foram encontradas diferenças significativas no consumo calórico e de macronutrientes entre os grupos [161].

Observou-se melhora nos marcadores laboratoriais da homeostase glicêmica em nível sistêmico, refletida pela diminuição das variáveis bioquímicas de glicose, hemoglobina glicosilada (HbA1c) e peptídeo C, que se mostraram significativamente reduzidas ao se comparar as medidas obtidas no período pré-operatório com as do pós-operatório. Esses achados são coerentes com os encontrados anteriormente [165, 166]. No entanto, nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos R e NR na remissão do DM2 frente à intensidade de perda de peso pós-operatória. Os níveis de glicemia no pós-operatório de 3 e 12 meses em relação ao pré-operatório diminuíram significativamente apenas no grupo R. A hemoglobina glicosilada também foi significativamente reduzida apenas no grupo R no período do pós-operatório de 12 meses comparado com o período pré-operatório. Com base no conjunto dessas alterações, algumas hipóteses sugeridas pela literatura no que se refere à rápida homeostase glicêmica após a DGYR, como a influência da perda de peso, menor consumo alimentar e tempo de DM2, acabam dando lugar a novas hipóteses para tal

acontecimento, como, por exemplo, o envolvimento dos ABs nessa regulação glicêmica.

7.3.2 Análise metabolômica

Do ponto de vista metabolômico, foram identificadas alterações significativas no perfil metabólico, que serão descritas nos tópicos a seguir.

7.3.2.1 Perfil de ABs fecais da amostra global de acordo com o tempo de DGYR

Considerando todas as nossas pacientes, observamos, após a DGYR, a redução dos níveis de 10 ABs fecais, a saber: CA, CDCA, TCDCA, GDCA, TCA, GCA, TLCA, TDCA, TUDCA e GUDCA. Em modelos animais, após a DGYR, foram descritas reduções significativas em ABs fecais totais e suas subfrações, dentre eles estão CA, CDCA, TCDCA, GCDCA, TCA, DCA, GLCA, TDCA, GDCA, TUDCA, LCA e UDCA [119, 149]. Em concordância, nosso estudo também encontrou redução significativa nos níveis de ABs fecais após a DGYR, principalmente ABs conjugados à glicina e à taurina, sendo 2 primários desconjugados, 4 conjugados e 4 ABs secundários conjugados. No entanto, não identificamos alterações nos níveis fecais dos ácidos secundários desconjugados litocólico (LCA), deoxicólico (DCA) e ursodeoxicólico (UDCA), previamente descritas em modelos experimentais [119, 149]. Vale lembrar que camundongos e humanos têm perfis de ácidos biliares diferentes, que podem afetar a sinalização de receptores de ácidos biliares, portanto, deve-se tomar cautela ao explorar os dados experimentais para humanos [74].

ABs conjugados podem ser desconjugados pela microbiota intestinal, especialmente por hidrolases de sais biliares (BSH) sintetizadas principalmente por *Lactobacillus, Bifidobacteria, Clostridium e Bacteroides* [75]. A maior parte dos ABs desconjugados sofre reações enzimáticas por bactérias intestinais e é transformada em ABs secundários, que são menos

solúveis e menos absorvíveis do que os ABs primários e, portanto, mais excretados nas fezes [72, 63].

A redução em ABs fecais após a DGYR poderia refletir o aumento da conjugação hepática de ABs primários, e, por fim, podemos sugerir adicionalmente que a redução na eliminação fecal de ABs observada após a DGYR também pode ser reflexo da absorção e da recirculação aumentadas pela via entero-hepática, que está de acordo com os níveis aumentados de ABs plasmáticos circulantes relatados após a DGYR em modelos animais e humanos, os quais têm sido considerados um mecanismo metabólico capaz de influenciar a homeostase glicêmica [116, 118, 119].

A absorção aumentada de ABs e a recirculação entero-hepática têm sido associadas com a ativação da via LXR/RXR no intestino [167]. De interesse,nosso laboratório observou, nas mesmas pacientes do presente estudo, o aumento na expressão, no jejuno, de genes que promovem ativação da via LXR/RXR em pacientes responsivas (grupo R)[161]. Por isso, acreditamos que mudanças nos níveis de ABs fecais possam refletir os processos associados com a remissão do DM2 pós-operatória de DGYR.

7.3.2.2 Alterações no perfil de ABs fecais intragrupo

Na presente investigação, observamos diferenças no perfil de ABs fecais entre pacientes responsivas (R) e não responsivas (NR) à remissão do DM2 após a DGYR. Verificamos maior número de subfrações de ABs significativamente reduzidas em pacientes do grupo R comparadas com as do grupo NR. Salientam-se os ABs: LCA, DCA, GDCA, GLCA, TDCA, TLCA, TCDCA e GUDCA. As reduções dos ABs foram observadas no período pós-operatório precoce quando comparadas com o período pré-operatório, já o AB GUDCA manteve-se significativamente reduzido também no período pós-operatório de 12 meses.

Pacientes do grupo R

- *CA, CDCA, DCA e LCA*

Em um estudo clínico, Albaugh VL et al. (2015) observaram aumento significativo nos níveis plasmáticos dos ABs desconjugados, CA e CDCA, e do AB secundário DCA e de seus conjugados no pós-operatório de 24 meses após a DGYR, não associados com qualquer medida antropométrica. No entanto, os autores sugerem que o aumento de ABs possa estar envolvido com o aumento do gasto energético e a redução do peso por meio de uma via estimulada pelo hormônio da tireoide, envolvendo o receptor TGR5. A ativação de TGR5 ileal aumenta os níveis de PYY com efeitos anorexígenos, bem como os níveis de GPL1 e GPL2 por meio de mecanismo que pode envolver a ativação do eixo GLP1-TGR5-AB. GLP1 promove liberação de insulina, reduz a secreção de glucagon do fígado, inibe a motilidade gastrintestinal e o consumo alimentar [67]. Os níveis elevados de ABs plasmáticos encontrados em estudos clínicos [118, 168-170] poderiam hipoteticamente explicar os níveis significativamente reduzidos de DCA fecal, em nosso estudo, especificamente no grupo de pacientes R. A menor excreção fecal de DCA poderia ser reflexo da maior absorção e recirculação hepática desse AB, o que poderia promover a ativação do eixo GLP1/ TGR5 ileal e o aumento da sensibilidade à insulina.

Outro achado interessante ao avaliarmos as alterações dos ABs ao longo do tempo, no grupo R, foi a redução significativa do metabólito LCA no período pós-operatório de 3 meses e de seus conjugados GLCA e TLCA, sendo que este último também esteve reduzido no pós-operatório de 12 meses comparado com o período pré-operatório. LCA fecal elevado tem sido considerado citotóxico [171] ao desencadear inflamação e aumento da permeabilidade epitelial [172]. É possível que a redução significativa de LCA fecal e de seus conjugados em pacientes do grupo R seja um fator de proteção celular.

- *UDCA e GUDCA*

Albaugh VL et al. (2015) também encontraram em estudo clínico UDCA, GUDCA e TUDCA plasmáticos significativamente aumentados após a DGYR [173]. UDCA é ácido biliar secundário e estereoisômero do ácido quenodeoxicólico (CDCA), que resulta da isomerização microbiana de CDCA no TGI. Por sua vez, GUDCA e TUDCA são provenientes da reabsorção de UDCA no TGI por meio da circulação entero-hepática com subsequente conjugação hepática [173]. Estudo clínico mostrou aumento significativo nos níveis de UDCA plasmático um mês após a DGYR, o qual retornou à concentração inicial (do pré-operatório) seis meses após a cirurgia. Vários estudos recentes são consistentes com a hipótese de que ABs derivados da microbiota estão relacionados com as melhorias imediatas na sensibilidade à insulina após a DGYR [174].

UDCA e GUDCA têm sido apontados como antagonistas para FXR intestinal [174,175], e acredita-se que esses ABs desempenham mecanismo correlacionado com melhorias metabólicas já nas primeiras semanas de DGYR [174, 176, 177].

De acordo com Mueller et al. (2015) [174], esses dois ABs, por meio da função antagônica ao FXR intestinal, conduzem o aumento da síntese de AB por meio da diminuição da expressão intestinal de FGF19, apesar de Dunn JP et al. (2012) [175] relatarem que o aumento precoce em UDCA/GUDCA um mês após a DGYR está associado com a melhora da sensibilidade à insulina, mas não parece estar relacionado com mudanças em FGF19. Jiang et al. (2015) destacam que inibidores seletivos de FXR estão sendo efetivos na reversão da obesidade e na melhora de parâmetros metabólicos [178]. Essas observações nos permitem sugerir que, na presente investigação, a redução significativa em GUDCA fecal no pós-operatório de 3 meses, e de 12 meses no grupo R, bem como a redução significativa de CDCA no pós-operatório de 3 meses no grupo R, tem relação com a inibição de FXR intestinal e ativação de FXR hepático.

Atualmente, especula-se a interação entre AB e a microbiota intestinal. UDCA e seus conjugados são formados a partir da transformação microbiana de CDCA [179.] Nesse cenário, a redução pós-operatória nos níveis de GUDCA e CDCA no grupo R pode estar relacionada com a melhora da sensibilidade à insulina. Sugeriríamos duas hipóteses para a redução de CDCA. Primeiro, o CDCA está sendo mais reabsorvido. Segundo, a composição da microbiota intestinal dos pacientes R está deficiente em bactérias que transformam CDCA em GUDCA. Entretanto, novos estudos são necessários para determinar a interação entre os ABs e o microbioma intestinal.

7.3.2.3 Alterações no perfil de ABs fecais entre os grupos R e NR

Dentre as alterações mais significativas, destacamos o aumento na razão CA/CDCA e a redução nos níveis de TUDCA fecal no grupo R quando comparado com o NR. A elevação da razão plasmática de ABs primários, CA/CDCA, pode ser observada durante a colestase. Em *hamsters* colestáticos, observou-se aumento na razão plasmática CA/CDCA e proporção reduzida de ABs desconjugados para AB total, por mecanismo associado com a inibição da enzima CYP27A1 [141], responsável pela síntese dos ácidos biliares primários CA e CDCA [66]. Essas mudanças no pool de ABs podem ser consideradas preditores negativos da síntese de AB. Em nossa pesquisa, encontramos aumento significativo da razão fecal de CA/CDCA em pacientes R no pós-operatório de 3 meses. Esse achado poderia refletir o aumento de CA e/ou diminuição de CDCA no intestino (por maior absorção). Além disso, pacientes do grupo R mostraram redução de várias subfrações de ABs fecais conjugados comparados com pacientes NR, o que poderia sugerir maior absorção de ABs conjugados no intestino de pacientes do grupo R. A razão CA/CDCA fecal aumentada no período do pós-operatório precoce em pacientes R também pode refletir a produção aumentada de CA e/ou diminuída de CDCA no fígado, no entanto, isso é menos consistente com o controle da homeostase glicêmica. Aumento na razão de CA/CDCA circulante já foi observado em mulheres grávidas com colestase intra-hepática e está

associado com níveis aumentados de triglicerídeos e glicemia de jejum, e níveis reduzidos de HDL-colesterol (semelhante às mudanças observadas na síndrome metabólica), quando comparado com mulheres grávidas saudáveis [71, 180-182]. Outro estudo, conduzido por Kimura et al. (1991), encontrou razão de CA/CDCA circulante anormalmente baixa em paciente pediátrico com colestase, o qual apresentou hipoglicemia severa [183]. Juntos, esses resultados sugerem que níveis elevados da razão CA/CDCA circulante favorecem a hiperglicemia, enquanto pacientes com razão CA/CDCA circulante baixa são propensos à hipoglicemia. O que apoia a hipótese de que na remissão do DM2 possa haver participação do metabolismo de ABs alterados precocemente após a DGYR, uma vez que encontramos aumento na razão CA/CDCA fecal no pós-operatório de 3 meses apenas no grupo R, ou seja, nós acreditamos que o aumento dessa razão entre ABs primários esteja relacionado com o melhor controle glicêmico pós-operatório imediato. Outro ponto que chamou a atenção em nosso estudo foi a redução significativa de TUDCA fecal observada no pós-operatório de 12 meses no grupo R. TUDCA é o ácido biliar UDCA conjugado com a taurina, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de doença hepática colestática[184]. Tratamento com TUDCA oral pode melhorar a sensibilidade à insulina e promover restauração de células beta pancreáticas via proteína quinase A (PKA) dependente de 3',5'-monofosfato de adenosina (AMP). A PKA tem função de regulação do glicogênio, açúcar e metabolismo lipídico [185-187]. Caso a síntese de TUDCA fosse aumentada no fígado, e/ou sua absorção maior no intestino, isso poderia se refletir em baixas concentrações desse metabólito nas fezes das nossas pacientes R e nos permitir sugerir um efeito potencial de TUDCA na remissão do DM2.

Vale a pena ressaltar que, como a DGYR restringe o tamanho do estômago, as nossas pacientes reduziram significativamente a ingestão de gordura [160] , o que favorece a redução de ABs redirecionados ao intestino para emulsificação de gorduras. Os grupos R e NR não apresentaram diferenças significativas no consumo de calorias e macronutrientes. No entanto, o perfil de ABs foi distinto entre pacientes R e NR em relação à remissão do DM2,

apontando que a modulação de ABs pela DGYR vai além do consumo restritivo.

7.3.2.4 Impacto da colecistectomia no perfil de ABs fecais antes e após a DGYR

As inter-relações entre obesidade, cirurgia bariátrica, microbiota e colecistectomia podem modificar de forma complexa a composição de ABs plasmáticos e fecais. Os pacientes obesos apresentam níveis reduzidos de ABs circulantes, comparados com os magros, bem como redução na expressão do cotransportador BSEP (bomba de exportação de sal biliar), responsável pelo efluxo de ácidos biliares nos hepatócitos e de proteínas cotransportadoras de sódio dependente de ácido biliar taurocólico (NTCP) [188], um dos principais transportadores dos ABs na circulação entero-hepática [189].

Após a colecistectomia, ocorre aumento nos movimentos intestinais, e, em geral, o tempo de trânsito intestinal é reduzido em 20%, o qual pode conduzir para maior perda de AB pelo intestino, ou seja, a maior concentração de ABs fecais [188, 190]. Em concordância, encontramos em nosso estudo aumento significativo de 4 ABs fecais (CA, CDCA, GCDCA e TCDCA) no grupo COLE comparado com o NOCOLE ainda no período pré-operatório. O aumento significativo nos níveis dos ABs primários desconjugados (CA e CDCA) permaneceu no grupo COLE no período de pós-operatório precoce. No período pós-operatório de 12 meses, encontramos TLCA, um AB secundário significativamente aumentado no grupo COLE. Nossos resultados estão em concordância com os de Zuccato et al. (1993), que, ao comparar pacientes colecistectomizados com controles saudáveis, observaram que os primeiros tiveram maiores concentrações fecais de LCA, CDCA, UDCA e da razão LCA/DCA do que os controles. Embora os autores não tenham observado aumento nos níveis de CA fecal, eles sugerem que a

colecistectomia induz a mudança significativa de CA para CDCA na bile, o que poderia justificar a elevação de CDCA nas fezes dos nossos pacientes [190].

A colecistectomia pode alterar as interações bidirecionais entre ABs e microbiota intestinal [188] ao aumentar a transformação de ácidos biliares primários fecais em secundários, devido à maior exposição de AB primário a bactérias intestinais [191, 190]. Em concordância com estudos prévios com colecistectomia, nós encontramos aumento de DCA fecal em nossas pacientes COLE no período pós-operatório de 3 e 12 meses da DGYR [190, 192-194].

7.3.2.5 Alterações no perfil de ABs fecais em pacientes R e NR não colecistectomizadas antes e após a DGYR

Na presente investigação, verificamos diferenças nas subfrações de ABs em pacientes R comparadas com as do grupo NR. No grupo R, observamos redução significativa de 6 ABs e aumento da razão CA/CDCA no pós-operatório precoce, comparando com o período pré-operatório, diferentemente do grupo NR, em que 4 ABs estiveram reduzidos. No período pós-operatório de 12 meses comparado com o pré-operatório, os dois grupos mantiveram as diferenças.

Pacientes R não colecistectomizadas

- *LCA*

LCA intestinal é AB secundário insolúvel e pouco reabsorvido (apenas 5%) [195]. Em altas concentrações plasmáticas, LCA induz quebra de cadeias de DNA, forma adutos de DNA e inibe as enzimas de reparo do DNA [196-198]. Quando presente no intestino em altas concentrações, causa danos inespecíficos na membrana celular, resultando em destruição focal do epitélio intestinal [171].

Em nosso estudo, o LCA fecal esteve reduzido nas 20 pacientes após a DGYR. No grupo R (n=12), a redução de LCA foi maior que a do grupo NR no período pós-operatório precoce em relação ao período pré-operatório.

O cotejamento dos dados de nossa investigação com os obtidos por Machado NM (2019), no plasma, permite sugerir alguns potenciais mecanismos de ação dos ABs na modulação metabólica após a DGYR. Machado NM observou que LCA plasmático, no grupo R, não se modifica após a DGYR, mas reduz significativamente no grupo NR. A influência dos ABs secundários pode se manifestar sobre o receptor da vitamina D (VDR) e o receptor TGR5. O VDR em humanos é ativado por LCA e 3-ceto-LCA com valores médios de concentração [195], entretanto, níveis muito baixos de LCA podem não ativar o VDR.

Como a influência do fator dietético pode ser afastada, nós poderíamos aventar que, no grupo R, as pacientes, ao estarem com níveis de LCA plasmático normais, podem ativar receptores VDR e participar na reversão do comprometimento do metabolismo hepático durante o diabetes [199].

É possível que no grupo NR a ativação de VDR não aconteça de forma adequada, e, consequentemente, esses pacientes acabariam por ter resultados metabólicos inferiores aos do grupo R com a DGYR [46].

Quanto à melhora da sensibilidade à insulina, Vrieze A et al. (2014) [200] mostraram que LCA plasmático em concentrações normais é capaz de ativar TGR5 e melhorar a resistência à insulina. A redução nas concentrações plasmáticas de LCA no grupo NR observada por Machado NM (2019) [46] poderia sugerir que o TGR5 estivesse menos ativado nos pacientes NR.

- CA/CDCA

A colecistectomia parece não modificar o comportamento da razão fecal dos ABs primários CA/CDCA após a DGYR. No período pós-operatório

de 3 meses, comparado com o período pré-operatório, em pacientes do grupo R, observamos aumento significativo da razão fecal de CA/CDCA, que poderia estar relacionado com melhor controle glicêmico pós-operatório imediato. Como descrita anteriormente, a alteração nos níveis de CA/CDCA após a DGYR em pacientes R pode envolver mecanismos que ativam o receptor FXR hepático e/ou têm participação na mudança da composição da microbiota intestinal nesse grupo após a DGYR [119].

- TUDCA

Nós observamos redução significativa do AB TUDCA fecal no grupo R nos períodos pós-operatórios de 3 e 12 meses comparados com o período pré-operatório. É possível que a redução na excreção fecal de TUDCA possa ser devido à sua maior absorção no grupo R. O AB TUDCA tem sido associado com a melhora da hiperglicemia [201]. Zhou L et al. (2009) observaram que a suplementação com TUDCA inibiu a autofagia defeituosa, preveniu lesão podocitária e reduziu o estresse de retículo endoplasmático e a inflamação em estudo misto experimental e humano [202]. Se a redução de TUDCA nas fezes for reflexo de sua síntese aumentada no fígado, e/ou absorção intestinal, isso poderia estar relacionado com a remissão pós-operatória de DM2 no grupo R.

7.3.3 Limitações

O nosso estudo sofre com algumas limitações. Para garantir a homogeneidade, o presente estudo incluiu apenas pacientes do sexo feminino, portanto, este estudo não pode ser extrapolado para subgrupo masculino.

Em relação ao desenho do estudo, foi reconhecido que a presente investigação reflete as alterações da resposta metabólica de um grupo de pacientes doentes. Nesse sentido, apesar de sua validade científica, para melhorar a compreensão sobre os eventos metabólicos descritos, ainda são

necessárias comparações com um grupo de controle composto por obesos não diabéticos submetidos aos mesmos procedimentos e com um grupo de pacientes eutróficos não diabéticos. Além disso, os mecanismos subjacentes aos distúrbios metabólicos observados em alguns pacientes obesos ainda são apenas parcialmente compreendidos, com vários autores sugerindo a necessidade de diferenciar obesos saudáveis de não saudáveis.

O tempo de acompanhamento após a DGYR foi relativamente curto, e o número de pacientes foi discreto, principalmente quando fizemos as subdivisões em R e NR, COLE e NOCOLE, e excluímos aqueles colecistectomizados das análises. No entanto, outros trabalhos que exploraram essa temática são apenas de cunho experimental [24, 119, 149].

Em relação aos desafios científicos, consideramos algumas limitações referentes à técnica analítica e à análise de dados. A identificação de metabólitos constitui um desafio em todas as abordagens de investigação metabolômica. Na presente pesquisa, as restrições de identificação de moléculas pelo modo *untarget* referem-se ao efeito da matriz biológica, que, por ser muito complexa, apresentou níveis de supressão iônica. Na identificação dos metabólitos no modo *targeted*, não foram realizadas curvas de calibração com todos os padrões internos, e, portanto, a identificação e a quantificação de muitas moléculas resultam de projeções estatísticas baseadas em um único ponto de referência, inserido no sistema de espectrometria de massas por injeção direta. Contudo, ao considerar a ampla variação biológica, entendemos que essa limitação não compromete os resultados da presente pesquisa. Em contrapartida, posteriormente, focamos na análise exclusiva de metabólitos envolvidos com o mecanismo de remissão do DM2 após a DGYR, previamente descritos na literatura [119].

Para aprofundar as investigações dos resultados aqui apresentados, este estudo será continuado. As pacientes prosseguem em acompanhamento ambulatorial, de forma que algumas delas já completaram 5 anos de acompanhamento pós-operatório. O estudo paralelo da microbiota intestinal

em amostras de fezes com o metaboloma fecal e plasmático poderá ajudar a explicar algumas mudanças aqui relatadas.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, em que mulheres obesas e com diabetes tipo 2 foram submetidas à DGYR e acompanhadas por 12 meses, é possível concluir que:

- A DGYR está associada com a alteração do perfil de metabólitos fecais;
- A DGYR está associada com a redução dos níveis de ácidos biliares fecais conjugados e desconjugados;
- O perfil de ácidos biliares fecais, após a DGYR, é distinto entre as pacientes responsivas à remissão total de diabetes mellitus tipo 2 e as não responsivas;
- No período pré-operatório, a concentração de ácidos biliares fecais em pacientes colecistectomizadas é maior do que a de não colecistectomizadas;
- Existem evidências de que no período pós-operatório, em pacientes não colecistectomizadas, o aumento da razão CA/CDCA e a redução nas concentrações de TUDCA, DCA e LCA estejam associados com a remissão total de diabetes tipo 2.

Corolário

Nos últimos anos, muito se aprendeu sobre a intrincada relação entre o metabolismo do ácido biliar, a genética do hospedeiro, a dieta e o microbioma intestinal. Todos esses campos e suas inter-relações poderão se converter em áreas de grande interesse terapêutico. Por exemplo, os dados do presente estudo permitem sugerir que a remissão do DM2 possa incluir ativação ou inibição de receptores nucleares, como FXR, TGR5 e VDR, via ação de ácidos biliares e, com isso, favorecer a melhora metabólica. No

entanto, novos estudos são necessários para determinar se as mudanças nas concentrações de ácidos biliares são causa ou consequência das mudanças no microbioma intestinal.

Anexos

Anexo 1. Técnicas analíticas para Metabolômica

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas em análises ômicas. De um modo geral, são empregadas análises em larga escala para a determinação simultânea de uma ampla quantidade de compostos de baixa massa molecular. As principais técnicas analíticas aplicadas a estudos envolvendo ciências ômicas são a. ressonância magnética nuclear; b. espectrometria de massas; c. cromatografia gasosa, d. cromatografia líquida, e eletroforese capilar [150].

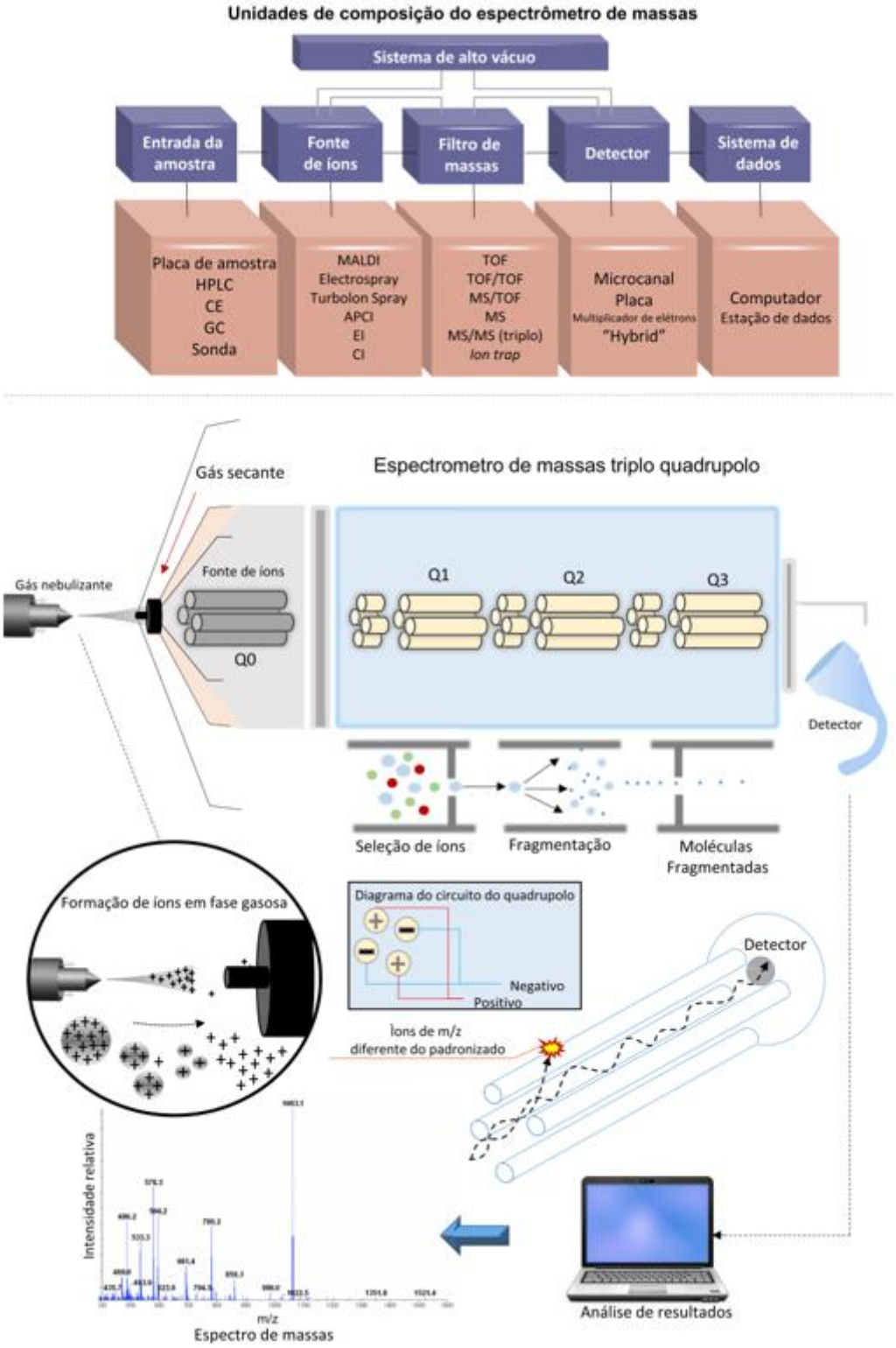
Espectometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é técnica muito utilizada para estudos de metabolômica. Ela permite identificar um número significativo de metabólitos, e a partir destes, estabelecer relações entre os processos metabólicos em curso e a condição biológica, e construir hipóteses guiadas por estes resultados [203].

A espectrometria de massas analisa compostos químicos a partir de um processo sofisticado de diferenciação e identificação de moléculas baseado na razão massa/carga (*m/z*). Para isso, a amostra de interesse é submetida a um processo rigoroso de preparo, e é inserida em um sistema de análise, sendo conduzida por três unidades básicas principais: câmara de ionização, analisador de massas e o detector [203].

A ionização é necessária para carregar eletricamente as moléculas para que seja possível a separação e seleção em relação a sua razão *m/z*. O processo de ionização na modalidade de electrospray (ESI) se inicia pela formação de um spray com gotículas altamente carregadas na presença de um campo elétrico aplicado à extremidade de uma agulha, por onde flui a amostra. As gotículas carregadas são liberadas através de um cone e um gás nebulizador, como N_2, flui longitudinalmente à agulha do ESI também auxiliando a formação das gotículas. Neste processo, o solvente da amostra

evapora e o raio das gotículas diminui gradativamente, aumentando a densidade de carga superficial até um certo limite. As gotículas se fragmentam em gotículas ainda menores, liberando íons, que são então direcionados para o analisador de massas. Um tipo de configuração híbrida usada em metabolômica consiste na combinação de um quadrupolo a um tempo de voo (TOF). Neste tipo de equipamento, o quadrupolo é usado para acumular e selecionar os íons ou moléculas ionizadas, que são ejetados no analisador TOF; no tubo do TOF as moléculas atravessam o sistema com determinada velocidade, que é proporcional ao seu tamanho e sua razão *m/z* [203]. A Figura 01 detalha o fluxo da análise metabolômica, resumindo os componentes dos equipamentos.



Adaptado Boja EM & Rodriguez H. 2011 [204]

Figura 1. Caracterização das unidades e do fluxograma de operação do espectrômetro de massas.

Legenda:
HPLC: Cromatografia líquida de alta performance
CE: Eletroforese capilar
GC: Cromatografia gasosa
MALDI: Ionização/desorção a laser assistida por matriz
APCI: Ionização química de pressão atmosférica
EI: Ionização de elétrons
CI: Ionização química
TOF: Tempo de voo
TOF/TOF: Tempo de voo/ Tempo de voo
MS/TOF: espectrometria de massas/tempo de voo
MS: Espectometria de massas
MS/MS (triplo): Espectometria de massas triplo quadrupolo
Ion trap: armadilha de íons
Hybrid: detector híbrido
Q0: entrada de íons no sistema de espectrometria de massas
Q1: unidade que seleciona os íons recém formados
Q2: célula de colisão, íons são fragmentados
Q3: unidade em que os ìons selecionados são direcionados ao detector

Considerando a variação do nível de complexidade e composição das amostras, são propostas diferentes maneiras de conduzir as análises. Devido a alta sensibilidade da espectrometria de massas, protocolos tradicionais preconizam a separação prévia de moléculas de acordo com as suas características físico-químicas, especialmente a polaridade, para favorecer a identificação de metabólitos. Os procedimentos de extração melhoram a qualidade das análises e são realizados na etapa que antecede a entrada da amostra no sistema de espectrometria de massas, com auxílio de cromatografia líquida ou gasosa, ou ainda, eletroforese capilar. A natureza das amostras e a classe de moléculas que se pretende estudar constituem pontos chave na escolha dos métodos a serem aplicados. Contudo, alguns estudos dispensam esta etapa e são conduzidos por injeção direta da amostra no espectrômetro de massas [203].

Apesar da possibilidade de otimização dos procedimentos de extração, a complexidade e a variedade das moléculas do metabolôma torna virtualmente impossível determinar todos os metabólitos simultaneamente utilizando apenas um tipo de plataforma. Além disso, ainda existe um grande número de metabólitos não identificados ou de função desconhecida. Por isso, é necessário realizar o planejamento adequado da pesquisa, de maneira que seja possível responder às perguntas que deram origem ao seu desenvolvimento. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica de ampla aplicação nos estudos metabolômicos, e se baseia na volatilidade dos compostos analisados, e sua interação com a fase estacionária. Como GC-MS é aplicável apenas a compostos voláteis, a derivatização das amostras biológicas, visando a transformação dos metabólitos em adutos voláteis, constitui uma etapa importante e necessária dos estudos metabolômicos por GC-MS. Se por um lado a presença desses adutos facilita a etapa posterior de identificação e construção de bibliotecas dedicadas de espectros, os esquemas de derivatização consomem muito tempo no preparo de amostras e limitam portanto, o número de amostras do estudo [203].

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), nos seus vários modos (fase reversa, RPLC, e por interação hidrofílica, HILIC) tem sido a técnica de escolha em estudos metabolômicos, pois permite uma maior cobertura metabólica de compostos apolares e moderadamente polares, que interagem diferencialmente com a fase móvel e fase estacionária [203].

Anexo 2. Aprovação pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/02/2011, **APROVOU as alterações** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **1011/09**, intitulado: **'ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO INTESTINAL E ADIPOSO VISCERAL DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 SUBMETIDOS À GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX"** apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**.

Carta datada de 21/01/11:
- **Adendo ao protocolo.**
- **Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**
- **Mudança de titulo para: "Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 Submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux"**
- **Relatório de andamento**

Comentários do relator(a) : "Projeto aprovado em 11 de fevereiro de 2010. Os autores encaminham em janeiro relatório de atividades no qual salientam a inclusão, até então, de 6 pacientes no estudo. Informam a alteração do titulo para inclusão do tecido gástrico na amostra, bem como TCLE com as alterações grifadas."

Pesquisador (a) Responsável: **Dan Linetzky Waitzberg**

Pesquisador (a) Executante: **Priscila Campos Sala**

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo 3. Desmembramento

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO GÁSTRICO, INTESTINAL E ADIPOSO VISCERAL DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 SUBMETIDOS À GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX
Pesquisador Responsável: Dan Linetzky Waitzberg **Versão: 1**
Pesquisador Executante: Priscila Campos Sala **CAAE:** 19339913.0.0000.0068
Finalidade Acadêmica Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: GASTROENTEROLOGIA

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros
Detalhe: Desmembramento de projeto.
Justificativa: Ilmo. Sr.
Data do envio: 09/06/2014

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 4241
Número do Parecer: 740.851
Data da Relatoria: 06/08/2014
Apresentação do Projeto: Solicita-se autorização para que o projeto, já APROVADO pela CAPPesq, seja desmembrado em subprojeto
para fins de TESE de DOUTORADO, tendo como Orientador Responsável: Prof. Dan Linetzky Waitzberg e a
pesquisadora executante: Camila de Siqueira Cardinelli. A nova pesquisa será intitulada: METABOLÔMICA
DA ÁGUA FECAL DE PACIENTES OBESOS PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 2 ANTES E APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA A Y DE ROUX (GRYR).
Objetivo da Pesquisa: Incluir pesquisadora e desmembrar projeto para tese de Doutorado.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não se alteram os riscos.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Foi apresentado o subprojeto que trata especificamente do assunto cujo objetivo é analisar os metabolitos
presentes na água fecal de pacientes obesos com diabetes tipo 2 antes e após GRYR.
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Mantém se o mesmo TCLE.
Recomendações: Não há.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há.
Situação do Parecer: Aprovado
Necessita Apreciação da CONEP: Não

São Paulo, 12 de Agosto de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 4. Termo de Consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux.”

PESQUISADOR : Priscila Campos Sala

CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRN 3-21249

UNIDADE DO HCFMUSP: CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	□	RISCO MÉDIO	X
RISCO BAIXO	□	RISCO MAIOR	□

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : Aproximadamente 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1 – Justificativa e os objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica que tem como objetivo avaliar se a cirurgia bariátrica melhora seu diabetes, e se essa possível melhora tem relação com a expressão de genes gástricos, intestinais e do tecido adiposo. A resposta a estas perguntas podem contribuir para o tratamento de pacientes diabéticos, a longo prazo. Este documento apresenta informações detalhadas sobre os propósitos, procedimentos, possíveis riscos ou desconfortos nela envolvidos, entre outras, para que você possa avaliar sua possível participação. Sua participação na pesquisa é voluntária e a não aceitação deste convite não trará nenhum prejuízo a você.

2 – Descrição dos procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são *experimentais*

Para participar desta pesquisa você deverá se encaixar em alguns critérios de seleção, pré-determinados pelos pesquisadores por ela responsáveis. Caso seu médico/nutricionista decida que você preenche esses critérios e você concordar em participar da pesquisa, você deverá assinar o o termo de “consentimento pós-esclarecido” presente no final deste documento e iniciar os procedimentos envolvidos em seu protocolo de estudo: Inicialmente serão realizadas 2 enteroscopias de duplo balão, a primeira será realizada aproximadamente 1 mês antes da gastroplastia e a segunda será realizada depois de 3 meses da cirurgia. Quando realizada por profissional treinado, a enteroscopia de duplo balão é considerada um exame seguro, muitas vezes solicitado para avaliação do padrão da mucosa gastrointestinal. Nesta pesquisa, as 2 enteroscopias serão feitas para coleta de pequenos fragmentos (aproximadamente 3 milímetros) de tecido gástrico e intestinal, para análise da expressão gênica. A possibilidade de ocorrer hemorragia (sangramento) durante esse procedimento é mínima, pois os fragmentos coletados restringem-se à camada mais superficial do tecido, chamada mucosa, onde a vascularização é pequena. O risco de hemorragia é maior quando se faz uso de medicamentos que possam “afinar” o sangue, como, por exemplo, o ácido acetil salicílico. Se você faz uso de algum medicamento com esta finalidade seu médico deverá suspendê-lo 7 dias antes da realização de cada enteroscopia, exceto se esse procedimento representar qualquer prejuízo à sua saúde ou tratamento. Nesse caso, você não participará do estudo. Durante a enteroscopia é necessário que você esteja em jejum e, após ela, você receberá uma fórmula nutricional liquida industrializada com sabor de baunilha. Após cada enteroscopia será realizada uma coleta de sangue (por punção periférica da veia do antebraço) para a dosagem de hormônios. Além das enteroscopias e

coletas de sangue, durante sua cirurgia seu médico irá coletar um pequeno fragmento de tecido adiposo (aproximadamente 1 grama) para análise de expressão gênica. No período pré e pós operatório (3 meses) você terá acompanhamento nutricional para avaliação do seu consumo alimentar assim como para avaliação da sua composição corporal. Durante esse acompanhamento nutricional você será orientado(a) a coletar urina de 24 horas e fezes para realização de exames laboratoriais.

3 – Desconfortos e riscos esperados

Considerando-se que os procedimentos descritos serão realizados por profissionais devidamente treinados e com experiência na sua condução, estes oferecem risco médio de trazer algum dano à sua condição clínica. O exame de enteroscopia de duplo balão é realizado frequentemente no Hospital das Clínicas e não é muito demorado. Você poderá sentir desconforto na punção da veia para o processo sedativo intravenoso. Pode acontecer desconforto abdominal, decorrente da distensão do intestino por injeção de ar. No entanto, este desconforto será diminuído pela própria sedação, por aspiração do ar insuflado e pelo oferecimento de drogas como o “luftal” para romper as bolhas de ar e “buscopan” para eventuais cólicas. Durante a enteroscopia, a sedação utilizada será monitorada por um anestesista que utiliza sedativos e anestésicos de curta ação, que mantém o paciente dormindo em torno de 10 – 15 minutos. As coletas de sangue serão feitas com agulha e seringa descartáveis, eliminando o risco de contaminação. A picada pode causar desconforto e pequenos hematomas que não oferecem risco à saúde. A retirada de fragmento de tecido adiposo não representa risco à saúde nem lhe causará nenhum desconforto, pois será feita durante sua operação e, portanto, você estará sedado e inconsciente. Para avaliação da composição corporal, os exames não são muito demorados, e não causam desconforto ou dor.

4 – Benefícios que poderão ser obtidos

Não há benefício direto para o participante.

5 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos alternativos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1 – Garantia de acesso

Você tem o direito de acessar seus registros médicos e informações sobre os procedimentos, de acordo com as leis nacionais, a qualquer momento, com o intuito de sanar possíveis dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. Caso haja alguma ocorrência decorrente dos procedimentos envolvidos nesta pesquisa, os pacientes deverão entrar em contato com Dr Dan L. Waitzberg, através do telefone: 3061-7459.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

2 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

Se você decidir participar deste estudo, você poderá sair dele a qualquer momento sem qualquer prejuízo, e isso não afetará de modo algum os cuidados futuros a serem recebidos de seu médico, seu nutricionista ou do hospital.

3 – Direito de confidencialidade

As informações obtidas nesta pesquisa através de sua participação terão acesso exclusivo à profissionais da saúde, e sem jamais revelar seu nome ou identidade.

4 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Você terá direito de saber os resultados dos seus exames individuais envolvidos na presente pesquisa, bem como seus resultados parciais.

5 – Despesas e compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

6 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa

Todo material coletado será utilizado exclusivamente para esse estudo.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Nutricionista: Priscila Campos Sala – 3061-7459/ 9336-3807 ou Dr. Dan L. Waitzberg – 3061-7459.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ”Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux”.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do paciente/representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do pesquisador Data ___/___/___

ANEXO 5. Recordatório alimentar 24 horas

MEDIDAS PADRÃO A SEREM SEGUIDAS NAS ANOTAÇÕES DAS REFEIÇÕES.

XC – Xícara de café (50 ml)

Xch – Xícara de chá (150 ml)

Cp– Copo tipo americano (150 ml)

Cpr– Copo de requeijão (300 ml)

C – Concha pequena (100 ml)

Cm – Concha média (150 ml)

Cg – Concha grande (200 ml)

Cs – Colher de sopa cheia (20 g)

Csb – Colher de sobremesa cheia (10 g)

Cchá – Colher de chá cheia (5 g)

Ca – Colher grande de servir arroz cheia (30g)

E – Escumadeira cheia (50 g)

Pchá – Pires de chá (50 g)

ps – Pires sobremesa cheio (100 g)

Fp – Fatia pequena

Fm – Fatia média

Fg– Fatia grande

Recordatório alimentar 24horas

Data: ____/_____/____ - Dia da semana: _____

Refeição	Alimento	Quantidade

Ingestão de água: _____

ANEXO 6. Registro alimentar de 7 dias

Registro alimentar de 7 dias (7 cópias desse modelo)

Data: ____/_____/____ - Dia da semana: _____

Refeição	Alimento	Quantidade

Ingestão de água: _____

ANEXO 7. Questionário de frequência alimentar

Produto	Porção consumida (n°/descrição)	Frequência							
		1x/dia	2 ou + x/dia	5 a 6x/sem.	2 a 4x/sem.	1x/sem.	1 a 3 x/mês	R/N	Qtd. g/ml
LEITE E DERIVADOS									
Leite-desnatado ou semi-desnatado									
Leite integral									
Iogurte									
Queijo branco (minas/frescal)									
Queijo amarelo (prato/mussarela)									
Requeijão									
CARNES E OVOS									
Ovo frito/mexido									
Ovo cozido									
Carne de boi									
Carne de porco									
Frango									
Peixe fresco									
Peixe enlatado (sardinha/atum)									
Embutidos (salsicha, linguiça, salame, presunto, mortadela)									
Carne conservada no sal (bacalhau, carne seca/sol, pertences de feijoada)									
Vísceras (fígado, rim, coração)									
ÓLEOS									
Azeite									
Molho para salada									
Bacon e toucinho									
Manteiga									
Margarina									
Maionese									
PETISCOS E ENLATADOS									
Snacks (batata-frita)									
Sanduíches, pizza, esfiha, salgadinhos, cheetos, amendoim									
Enlatados (milho, ervilha, palmito, azeitona)									
CEREAIS/LEGUMINOSAS									
Arroz integral									
Arroz polido									
Pão integral									
Pão francês/forma									

Produto	Porção consumida (n°/descrição)	Frequência							
		1x/dia	2 ou + x/dia	5 a 6x/sem.	2 a 4x/sem.	1x/sem.	1 a 3 x/mês	R/N	Qtd. g/ml
Biscoito salgado									
Biscoito doce									
Bolos									
Macarrão									
Feijão									
HORTALIÇAS E FRUTAS									
Folha crua: - -									
Folha refogada/cozida: - -									
Hortaliça crua: - -									
Hortaliça cozida: - -									
Tubérculos (mandioca, batata, inhame)									
Frutas: - -									
SOBREMESAS E DOCES									
Sorvete									
Tortas									
Geléia									
Doces/balas									
Chocolates/achocolatados/bombom									
BEBIDAS									
Café com açúcar									
Café sem açúcar									
Suco natural com açúcar									
Suco natural sem açúcar									
Suco artificial com açúcar									
Suco artificial sem açúcar									
Refrigerante normal									
PRODUTOS DIET E LIGHT									
Adoçante									
Margarina									
Requeijão/iogurte									
Refrigerante									

Referências

REFERENCIAS

1. Xie B, Waters MJ, Schirra HJ. Investigating Potential Mechanisms of Obesity by Metabolomics. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:805683.

2. Kaiyala KJ, Schwartz MW. Toward a more complete (and less controversial) understanding of energy expenditure and its role in obesity. Diabetes. 2011;60(1):17-23.

3. Angelakis E. Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. Future Microbiol. 2012:7(1):91-109.

4. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. J Clin Invest. 2011;121(6):2126-32.

5. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. Nat Rev Drug Discov. 2008;7(2):123-9.

6. Ravussin Y, Koren O, Spor A, LeDuc C, Gutman R, Stombaugh J, Knight R, Ley RE, Leibel RL. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. Obesity (Silver Spring). 2012;20(4):738-47.

7. Gong J, Yang C. Advances in the methods for studying gut microbiota and their relevance to the research of dietary fiber functions. Food Research International. 2012;48(2):916-29.

8. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. Annu Rev Med. 2011;62:361-80.

9. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, Toplak H; Obesity Management Task Force of the European Association for the Study of Obesity. European Guidelines for Obesity Management in Adults. Obes Facts. 2015;8(6):402-24.

10. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carisson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. N Engl J Med. 2004;351(26):2683-93.

11. Thomas S, Schauer P. Bariatric surgery and the gut hormone response. Nutr Clin Pract. 2010;25(2):175-82.

12. Yu H, Zheng X, Zheng Z. Mechanism of Roux-en Y gastric by-pass treatment for type 2 diabetes in rats. J Gastrointest Surg. 2013;17(6):1073-83.

13. Samat A, Malin Sk, Huang H, Schauer PR, Kirwan JP, Kashyap SR. Ghrelin suppression is associated with weight loss and insulin action following gastric by-pass surgery at 12 months in obese adults with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2013;15(10):963-6.

14. Lin E, Davis SS, Srinivasan J, Sweeney JF, Ziegler TR, Philips L, Gletsu-Miller N. Dual mechanism for type 2 diabetes resolution after roux-en-Y-gastric by-pass. Am Surg. 2009;75(6):498-503.

15. Frühbeck G. Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and sucess criteria. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(8):465-77.

16. Bhasker AG, Remedios C, Batra P, Sood A, Shaikh S, Lakdawala M. Predictors of remission od T2DM and metabolic effects after laparoscopic Roux-en-y-gastric bypass in obese Indian diabetics - a 5-year study. Obes Surg. 2015;25(7):1191-7.

17. Frota NM, Barros LM, Moreira RAN, Araujo TM, Ca\etano JA. Avaliação dos resultados da cirurgia bariátrica. Rev Gaúcha Enferm. 2015;36(1):21-7.

18. Al Assal K. Análise da microbiota fecal em pacientes obesas graves portadoras de diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

19. Buchwald H, Orien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. Obes Surg. 2013:23(4):427-36.

20. Wilson JB, Pories WJ: Durable remission of diabtes after bariatric surgery: What is the underlying pathway? Insulin. 2010;5(1):46-55.

21. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. Nat Rev Gastroenterol Hepal. 2012;9(10):590-8.

22. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. Diabetologia. 2010; 53(4):606-13.

23. Mutch DM, Fuhrmann JC, Rein D, Wiemer JC, Bouillot JL, Poitou C, Clément K. Metabolite profiling identifies candidate markers reflecting the clinical adaptations associated with Roux-em-Y gastric bypass surgery. PloSone. 2009;4(11):e7905.

24. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, Bloom SR, Darzi A, Athanasiou T, Marchesi JR, Nicholson JK, Holmes E. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. Gut. 2011;60(9):1214-23.

25. Cardinelli CS, Torrinhas RS, Sala P, Pudenzi MA, Fernando F Angolini C, Marques da Silva M, Machado NM, Ravacci G, Eberlin MN, Waitzberg DL. Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: a preliminary study. Clin Nutr. 2019 Jan 22.

26. Musich S, MacLeod S, Bhattarai GR, Wang SS, Hawkins K, Bottone FG Jr, Yeh CS. The impact of obesity on health care utilization and expenditures in a medicare supplement population. Gerontol Geriatr Med. 2016;2:2333721415622004.

27. IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE; 2015.

28. Kolb H, Eizirik DL. Resistance to type 2 diabetes mellitus: a matter of hormesis? Nat Rev Endocrinol. 2011;8(3):183-92.

29. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7a ed. Brussels: Iinternational Diabetes Federation. 2015.

30. Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in whole blood gene expression. in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. PLoS One. 2011;6(3):e16729.

31. Isser BPM, Stopa SR, Chueiri OS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HOC, Duncan BB, Schmidt MI. Self-reported diabetes prevalence in Brazil: results from National Health Survey 2013, Epidemiol Serv Saúde. 2015;24(2):305-14.

32. Pesquisa nacional de saúde: 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes regiões / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2015. 92 p.

33. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistence in type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2010;1(3):68-75.

34. Ginsberg HN. Insulin resistence and cardiovascular disease. J Clin Invest. 2000;106(4):453-8.

35. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities Antioxid Redox Signal. 2010;12(4):537-77.

36. Lindekilde N, Gladstone BP, Lübeck M, Nielsen J, Clausen L, Vach W, Jones A. The impact of bariatric surgery on quality of life: a systematic review and meta-analysis. Obesid rev. 2015 Aug; 16(8):639-51.

37. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, Mattar S, Ramanathan R, Barinas-Mitchel E, Rao RH, Kuller L, Kelley D. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric by-pass on type 2 diabetes mellitus. Ann Surg. 2003;238(4):467-84

38. Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric surgery. Int J Obes (Lond). 2009;33 Suppl 1:S33-40.

39. Associação brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4. Ed. São Paulo, SP: ABESO; 2016.

40. Campos, Josemberg M., et al. "Cirurgia metabólica, reganho de peso e recidiva do diabete." *ABCD arq. bras. cir. Dig* 26.supl. 1 (2013): 57-62.

41. Mahawar KK, Kumar P, Parmar C, Graham Y, Carr WR, Jennings N, Schroeder N, Balupuri S, Small PK. Small bowel limb lengths and Roux-en-Y-gastric bypass: a systematic review. Obes Surg. 2016;26(3):660-71.

42. Valezi AC, Marson AC, Merguizo RA, Costa FL. Roux-en-Y gastric bypass: limb leght and weight loss. Arq Bras Cir Dig. 2014;27 Suppl 1:56-8.

43. Negaard BJ, Leifsson BG, Hedenbro J, Gislason H. Gastric bypass with long alimentary limb and long pacreato-biliary limb long-term results on weight loss, resolution of co-morbidities and metabolic parameters. Obes Surg. 2014;24(10):1595-602.

44. Cho JM, Kim Hj, Menzo EL, Park S, Szomstein S, Rosenthal RJ. Effect of sleeve gastrectomy on type 2 diabetes as an alternative treatment modality to Roux en Y gastric bypass: systemic review and meta-analysis. Surg Obes Relat Dis. 2015;11(6):1273-80.

45. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM Jr, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. Sci Transl Med. 2013;5(178): 178ra41.

46. Machado NM. Impacto da derivação gástrica em Y de Roux no perfil metabolômico global de mulheres obesas portadoras de diabetes tipo 2. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

47. Sala P, Belarmino G, Machado NM, Cardinelli CS, Al Assal K, Silva MM, Fonseca DC, Ishida RK, Santo MA, de Moura EG, Sakai P, Guarda IF, da Silva ID, Rodrigues AS, Pereira CA, Heymsfield S, Doré J, Torrinhas RS, Giannella-Neto D, Waitzberg DL. The SURMetaGIT study: design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. J Int Med Res. 2016;44 (6):1359-75.

48. Nyangale EP, Mottram DS, Gibson GR. Gut microbial activity, implications for health and disease: the potencial role of metabolite analysis. J Proteome Res. 2012;11(12):5573-85.

49. Jacobs DM, Gaudier E, Duynhoven JV, Vaughan EE. Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. Curr Drug Metab. 2009;10(1):41-54.

50. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science. 2012;336(6086):1262-7.

51. Patti GJ, Tautenhahn R, Rinehart D, Cho K, Shriver LP, Manchester M, Nikolskiy I, Johnson CH, Mahieu NG, Siuzdak G. A view from above: cloud plots to visualize global metabolomic data. Anal Chem. 2013; 85(2): 798-804.

52. Suhre K, Gieger C. Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications. Nat Rev Genet. 2012;13 (11):759-69.

53. Rezzi S, Ramadan Z, Fay LB, Kochhar S. Nutritional metabonomics: applications and perspectives. J Proteome Res. 2007;6(2):513-25.

54. Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuohy KM, McCartney AL, Gibson GR, Nicholson JK.. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. J Proteome Res. 2009;8(5):2361-75.

55. Zhang A, Sun H, Wang X. Power of metabolomics in biomarker discovery and mining mechanisms of obesity. Obes Rev. 2013;14(4):344-9.

56. Han J, Antunes LC, Finlay BB, Borchers CH. Metabolomics: towards understanding host–microbe interactions. Future Microbiol. 2010;5(2):153-61.

57. Zheng X, Xie G, Zhao A, Zhao L, Yao C, Chiu NH, Zhou Z, Bao Y, Jia W, Nicholson JK, Jia W. The footprints of gut microbial–mammalian co-metabolism. J Proteome Res. 2011;10(12):5512-22.

58. Holmes E, Li JV, Athanasiou T, Ashrafian H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. Trends Microbiol. 2011;19(7):349-59.

59. Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? J Obes. 2012;2012:879151.

60. Li JV et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. Gut. 2011; 60(9):1214-23.

61. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaption and its effect in obesity. Physiol Behav. 2014;136:74-8.

62. Li JV, Reshat R, Wu Q, Ashrafian H, Bueter M, le Roux CW, Darzi A, Athanasiou T, Marchesi JR, Nicholson JK, Holmes E, Gooderham NJ. Experimental bariatric surgery in rats generates a citotoxic chemical environment in the gut contents. Front Microbiol. 2011;2:183.

63. Lieberman M, Marks AD. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 4 ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 1014 p.

64. Mcdonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. Animal nutrition. 7 ed. Canada: Pearson; 2010. 712 p.

65. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. J Lipid Res. 2009;50(10):1955-66.

66. Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. Pharmacol rev. 2014;66 (4):948-83.

67. Nelson RW, Couto GC. Medicina interna de pequenos animais. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 1324 p.

68. Guyton AC, Hall JE. Funções secretoras do tubo alimentar. In: Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. Cap. 64, p. 617-631.

69. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. J Lipid Res. 2006;47(2):241-59.

70. Samuelson DA. Tratado de histologia veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527 p.

71. Dawson PA and Saul JK. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *Journal of lipid research* 56.6 (2015): 1085-1099.

72. Fiorucci S, Distrutti E. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. Trends Mol Med. 2015;21(11):702-14.

73. Eyssen H. influence of microbial bile salt desulfation upon the fecal excretion of bile salts in gnotobiotic rats. J Steroid Biochem. 1985;22(4):547-54.

74. Wahlström A, Sayin SI, Marschall H, Backhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. Cell Metab. 2016;24(1):41-50.

75. Li T, Apte U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. Adv Pharmacol. 2015;74:263-302.

76. Martin FP, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IK, Tang H, et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. Mol Syst Biol. 2007;3(1):112.

77. Ding L, Yang L, Wang Z, Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. Acta Pharm Sin B. 2015;5(2):135-44.

78. Midtvedt T. Microbial bile acid transformation. Am J Clin Nutr. 1974;27(11):1341-7.

79. Vlahcevic ZR, Heuman DM Hylemon PB. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In: Zakim D, Boyer T, editors. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. 3rd edition. Vol. 1. Philadelphia, PA: Saunders; 1996. p.376-417.

80. Reddy BS, Wynder EL. Metabolic epidemiology of colon cancer: fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. Cancer. 1977;39:2533-9.

81. Paumgartner G, Stiehl A. Falk Symposium 24: Bile Acid Metabolism in Health and Disease. Baltimore, MD: University Park Press; 1976. p. 167-72.

82. Islam KS, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, Yokota A. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. Gastroenterology. 2011;141(5):1773-81.

83. Ocvirk S, Stephen JD O'Keefe. Influence of bile acids on colorectal cancer risk: potential mechanisms mediated by diet-gut microbiota interactions. Curr Nutr Rep. 2017;6:315-22.

84. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. Science. 2013; 341(6150):1241214.

85. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. EMBO J. 2006;25(7):1419-25.

86. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. Cell. 1995;81(5):687-93.

87. Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. Mol Endocrinol. 1995;9(1),72-85.

88. Cariou B, Van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. J Biol Chem. 2006;281(16):11039-49.

89. Zhang· Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. J Biol Chem. 2003;278(1):104-10.

90. Huber RM, MurphyK, MiaoB, LinkJR, Cunningham MR, Rupar MJ, et al. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. Gene. 2002;290:35-43.

91. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. Science. 1999;284(5418):1362-5.

92. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. Science. 1999;284(5418):1365-8.

93. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. Mol Cell. 1999;3(5):543-53.

94. Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. Mol Cell Endocrinol. 2013;368:17-29.

95. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. Mol Cell. 2000;6(3):517-26.

96. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. Cell Metab. 2005;2(4):217-25.

97. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X Receptor: A molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:2020-31.

98. De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M. Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. J Biol Chem. 2003;278:39124-32.

99. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. J Biol Chem. 2004;279:23158-65.

100. Bennion LJ, Grundy SM. Effects of diabetes mellitus on cholesterol metabolism in man. N Engl J Med. 1977;296:1365-71.

101. Prawitt J, Staels B. Bile acid sequestrants: glucose-lowering mechanisms. Metab Syndr Relat Disord. 2010;8 Suppl 1:S3-8.

102. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M et al. AG protein-coupled receptor responsive to bile acids. J Biol Chem. 2003; 278(11):9435-40.

103. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochem Biophys Res Commun. 2005;329(1):386-90.

104. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov. 2008;7(8):678-93.

105. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. Cell Metab. 2009;10:167-77.

106. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012;427(3):600-5.

107. Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. Biochim Biophys Acta. 2010;1802(3):363-72.

108. Kumar DP, Asgharpour A, Mirshahi F, Park SH, Liu S, Imai Y et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 modulates pancreatic islet α cells to promote glucose homeostasis. J Biol Chem. 2016;291(13):6626-40.

109. Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav E. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. J Exp Med. 2018;215(2):383-96.

110. Khurana VG, Katusic ZS. Gene transfer for cerebrovascular disease. Curr Cardiol Rep. 2001;3(1):10-6.

111. Mráz M, Lacinová Z, Kaválková P, Haluzikova D, Trachta P, Drapalova J, et al. Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR-α agonist treatment. Physiol Res. 2011;60(4):627-36.

112. Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. Int J Obes (Lond). 2013;37(12):1553-9.

113. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. Obesity. 2009;17(9):1671-7.

114. Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganolipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, et al. The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. Endocrinology. 2012;153(8):3613-9.

115. Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE et al. Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. Nat Commun. 2015;6:7715.

116. Kohli R, Bradley D, Setchell KD, Eagon JC, Abumrad N, Klein S. Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic

adjustable gastric banding increases circulating bile acids. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(4):E708-12.

117. Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkelä, P, Pääkkönen M, et al. Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass. Obes Surg. 2012;22(9):1473-80.

118. Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T, et al. Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: a 1-year prospective randomized pilot trial. Obesity. 2013;21(12):E660-8.

119. Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on bile acid metabolism in normal and obese diabetic rats. PloS one. 2015;10(3):e0122273.

120. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. Pharmacogenomics J. 2013;13(6):514-22.

121. Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot, JL, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. Am J Clin Nutr. 2013;98(1):16-24.

122. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. Genome Med. 2016;8(1):67.

123. Pesquisa nacional de saúde: 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes regiões / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2015. 92p.

124. Cuppari L, Schor NS. Nutrição Clínica no Adulto. 3a. São Paulo: Manole; 2013. 569 p.

125. Nam Han Cho (chair), Joses Kirigia JC, Mbanya, Katherine Ogurstova LG, Wolfgang Rathmann, Gojka Roglic NF, Rana Dajani, Alireza Esteghamati, Edward Boyko I, Hambleton, Otaliba Libânio de Morais Neto P, Aschner Montoya, Shashank Joshi JC, et al. IDF Diabetes Atlas 2017. 8a. ed.

126. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Brussel; International Diabetes Federation; 2006.

127. Monteiro JP, Chiarello PG. Consumo alimentar: visualizando porções. Rio de Janeiro: Grupo Gen-Guanabara Koogan; 2000.

128. Silva MM, Sala PC, Cardinelli CS, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Comparison of Virtual Nutri Plus® and Dietpro 5i® software systems for the assessment of nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. Clinics. 2014;69(11):714-22.

129. Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutritional. Barueri, SP: Manole; 2013. 164 p.

130. Lima DM. Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO. Campinas, SP: Nepa-Unicamp; 2006.

131. Bussab WO, Moretin PA. Estatística Básica. 8ª ed. São Paulo: Saraiva; 2013.

132. Gibbons JD, Chakraborti S. Nonparametric statistical Inference. 5ª ed. London: Chapman and Hall/CRC; 2010.

133. Holmes E, Cloarec O, Nicholson JK. Probing latent biomarker signatures and in vivo pathway activity in experimental disease states via statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) of biofluids: application to HgCl2 toxicity. J Proteome Res. 2006;5(6):1313-20.

134. Wold S, Sjostrom LEM. PLS-regression: a basic tool of chemometric. Chemom Int Lab Syst. 2011;58:109-30.

135. Ramsay SL, Stoegg WM, Weinberger 447 KM, et al. Apparatus and method for analyzing a metabolite profile. U.S. Patent No. 8,265,877.

136. Xia J, Sinelnikov I, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0 – making metabolomics more meaningful. Nucleic Acids Res. 2015;43(W1):W251-7

137. Teste t de Student. Disponível em: http://sistemas.eeferp.usp.br/myron/arquivos/2540410/e8fc3b72347400901a 275 0cb214bf4e0.pdf Estatística Não-Paramétrica.

138. Lowry R. Concepts & applications of inferential statistics. Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics Bulletin. 1945;1(6):80-3.

139. Paulino CD, Pestana D, Branco J, Singer J, Barroso, L, Bussab, W. Glossário Inglês-Português de Estatística. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Estatística e Associação Brasileira de Estatística; 2011. p.95.

140. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi SE, et al. How do we define cure of diabetes? Diabetes Care. 2009;32(11):2133-5.

141. Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. Ann Intern Med. 2005;142 (7), 547-59.

142. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2004; 292(14):1724-37.

143. Pournaras DJ, le Roux CW. Preventing type 2 diabetes, CVD, and mortality: surgical versus non-surgical weight loss strategies. Curr Atheroscler Rep. 2013;15(11):367.

144. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. Compr Physiol. 2013;3(3):1191-212.

145. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(4):1006-11.

146. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, Fearnside J, Tatoud R, Blanc V, Lindon JC, Mitchell SC, Holmes E, McCarthy MI, Scott J, Gauguier D, Nicholson JK. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(33):12511-6.

147. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nat Rev Microbiol. 2005;3(5):431-8.

148. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. J Proteome Res. 2007;6(2):546-51.

149. Lindqvist A, Ekelund M, Garcia-Vaz E, Ståhlman M, Pierzynowski S, Gomez MF, et al. The impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on normal metabolism in a porcine model. PloS one. 2017;12(3):e0173137.

150. Norheim F, Gjelstad I, Hjorth M, Vinknes K, Langleite T, Holen T, et al. Molecular nutrition research—the modern way of performing nutritional science. Nutrients. 2012;4(12):1898-944.

151. Villas-Bôas, S. G., and A. K. Gombert. Análise do Metaboloma—Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnol Cienc Desenvolv* 36 (2006): 58-69.

152. Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. PloS One. 2009;4(7):e6386.

153. Zhang Y, Ge X, Heemstra LA, Chen WD, Xu J, Smith JL, et al. Loss of FXR protects against diet-induced obesity and accelerates liver carcinogenesis in ob/ob mice. Mol Endocrinol. 2012;26(2):272-80.

154. Trygg J, Svante W. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). J Chemom. 2002;16(3):119-28.

155. Canuto GA, Costa JLD, da Cruz PL, Souza ARLD, Faccio AT, Klassen A, et al. Metabolomics: definitions, state-of-the-art and representative applications. Química Nova. 2018;41(1):75-91.

156. Xiao J, Zhao Y, Varghese RS, Zhou B, Di Poto C, Zhang L, et al. Evaluation of metabolite biomarkers for hepatocellular carcinoma through stratified analysis by gender, race, and alcoholic cirrhosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(1):64-72.

157. Hoffman JM, Soltow QA, Li S, Sidik A, Jones DP, Promislow DE. Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, Drosophila melanogaster. Aging Cell. 2014;13(4):596-604.

158. Santo MA, Riccioppo D, Pajecki D, Kawamoto F, de Cleva R, Antonangelo L, et al. Weight regain after gastric bypass: influence of gut hormones. Obes Surg. 2016;26(5):919-25.

159. Pajecki D, Dalcanalle L, Souza de Oliveira CP, Zilberstein B, Halpern A, Garrido AB Jr, Cecconello I. Follow-up of Roux-en-Y gastric bypass patients at 5 or more years postoperatively. Obes Surg. 2007;17(5): 601-7.

160. Silva MM. Análise da ingestão e suplementação nutricionais de pacientes bariátricas atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

161. Kobal PS. Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux. Diss. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

162. Miller GD, Norris A, Fernandez A. Changes in nutrients and food groups intake following laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). Obes Surg. 2014;24(11):1926-32.

163. Gesquiere I, Foulon V, Augustijns P, Gils A, Lannoo M, Van der Schueren B, Matthys C. Micronutrient intake, from diet and supplements, and association with status markers in pre-and post-RYGB patients. Clin Nutr. 2017;36(4):1175-81.

164. Verger EO, Aron-Wisnewsky J, Dao MC, Kayser BD, Oppert JM, Bouillot JL, et al. Micronutrient and protein deficiencies after gastric bypass and sleeve gastrectomy: a 1-year follow-up. Obes Surg. 2016;26(4):785-96.

165. Candian DCF. Respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à derivação gástrica em Y de Roux e sua correlação com homeostase glicêmica em pacientes obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2. Diss. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

166. Karra E, Yousseif A, Batterham RL. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(6):337-44.

167. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. J Hepatol. 2013;58(1):155-68.

168. Nemati R, Lu J, Dokpuang D, Booth M, Plank LD, Murphy R. Increased bile acids and FGF19 after sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass correlate with improvement in type 2 diabetes in a randomized trial. Obes Surg. 2018;28(9):2672-86.

169. Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. Int J Obes (Lond). 2013;37(12):1553-9.

170. Nakatani H, Kasama K, Oshiro T, Watanabe M, Hirose H, Itoh H. Serum bile acid along with plasma incretins and serum high–molecular weight adiponectin levels are increased after bariatric surgery. Metabolism, 2009;58(10):1400-7.

171. Ajouz H, Mukherji D, Shamseddine A. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. World J Surg Oncol. 2014;12

172. Stenman LK, Holma R, Gylling H, Korpeta R. Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity. Br J Nutr. 2013;110(6):1157-64.

173. Albaugh VL, Flynn CR, Cai S, Xiao Y, Tamboli RA, Abumrad NN. Early increases in bile acids post Roux-en-Y gastric bypass are driven by insulin-sensitizing, secondary bile acids. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(9):E1225-33.

174. Mueller, Michaela, et al. "Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity." *Journal of hepatology* 62.6 (2015): 1398-1404.

175. Dunn JP, Abumrad NN, Breitman I, Marks-Shulman PA, Flynn CR, Jabbour K, et al. Hepatic and peripheral insulin sensitivity and diabetes remission at 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients randomized to omentectomy. Diabetes Care. 2012;35(1):137-42.

176. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. Cell Metab. 2013;17(2):225-35.

177. Wang YD, Chen WD, Yu D, Forman BM, Huang W. The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-κB) in mice. Hepatology. 2011;54(4):1421-32.

178. Jiang C, Xie C, Li F, Zhang L, Nichols RG, Krausz KW, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2015;125(1):386-402.

179. Cao H, Huang H, Xu W, Chen D, Yu J, Li J, Li L. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2011;691(1-2):68-75.

180. Matsuzaki Y, Bouscarel B, Ikegami T, Honda A, Doy M, Ceryak S, et al. Selective inhibition of CYP27A1 and of chenodeoxycholic acid synthesis in cholestatic hamster liver. Biochim Biophys Acta. 2002;1588(2):139-48.

181. Jurate K, Rimantas Z, Jolanta S, Vladas G, Limas K. Sensitivity and specificity of biochemical tests for diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. Ann Hepatol. 2017;16(4):569-73.

182. Martineau MG., Raker C, Dixon PH, Chambers J, Machirori M, King NM, et al. The metabolic profile of intrahepatic cholestasis of pregnancy is associated with impaired glucose tolerance, dyslipidemia, and increased fetal growth. Diabetes Care. 2015;38(2):243-8.

183. Kimura A, Ushijima K, Kage M, Mahara R, Tohma M, Inokuchi T, et al. Neonatal Dubin-Johnson syndrome with severe cholestasis: effective phenobarbital therapy. Acta Paediatr Scand. 1991;80(3):381-5.

184. Paridaens A, Raevens S, Colle I, Bogaerts E, Vandewynckel YP, Verhelst X, et al. Combination of tauroursodeoxycholic acid and N-acetylcysteine exceeds standard treatment for acetaminophen intoxication. Liver Int. 2017;37(5):748-56.

185. Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, et al. Tauroursodeoxycholic acid may improve liver and muscle but not adipose

tissue insulin sensitivity in obese men and women. Diabetes. 2010;59(8):1899-905.

186. Lee YY, Hong SH, Lee YJ, Chung SS, Jung HS, Park SG, Park KS. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. Biochem Biophys Res Commun. 2010;397(4):735-9.

187. Knighton DR, Buechler JA, Taylor SS. cAMP-dependent protein kinase: mechanism for atp: protein phosphotransfer. peptides and protein phosphorylation. CRC Press; 2018. p.1-41.

188. Keren N, Konikoff FM, Paitan Y, Gabay G, Reshef L, Naftali T, Gophna U. Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients. Environ Microbiol Rep. 2015;7(6):874-80.

189. Doering B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. Curr Top Membr. 2012;70:105-68.

190. Zuccato E, Venturi M, Di Leo G, Colombo L, Bertolo C, Doldi SB, Mussini E. Role of bile acids and metabolic activity of colonic bacteria in increased risk of colon cancer after cholecystectomy. Dig Dis Sci. 1993;38(3):514-9.

191. Wang W, Wang J, Li J, Yan P, Jin Y, Zhang R, et al. Cholecystectomy damages aging-associated intestinal microbiota construction. Front Microbiol. 2018;9:1402.

192. Malagelada JR, Go VL, Summerskill WH, Gamble WS. Bile acid secretion and biliary bile acid composition altered by cholecystectomy. Am J Dig Dis. 1973;18(6):455-9.

193. Hepner GW, Hofmann AF, Malagelada JR, Szczepanik PA, Klein PD. Increased bacterial degradation of bile acids in cholecystectomized patients. Gastroenterology. 1974;66(4):556-64.

194. Pomare EW, Heaton KW. The effect of cholecystectomy on bile salt metabolism. Gut. 1973;14(10):753-62.

195. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. Science. 2002;296(5571):1313-6.

196. Nagengast FM, Grubben MJ, Van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. Eur J Cancer. 1995;31A(7-8):1067-70.

197. Hamada K, Umemoto A, Kajikawa A, Seraj MJ, Monden Y. In vitro formation of DNA adducts with bile acids. Carcinogenesis. 1994;15(9):1911-5.

198. Ogawa A, Murate T, Suzuki M, Nimura Y, Yoshida S. Lithocholic acid, a putative tumor promoter, inhibits mammalian DNA polymerase β. Jpn J Cancer Res. 1998;89(11):1154-9.

199. George N, Kumar TP, Antony S, Jayanarayanan S, Paulose CS. Effect of vitamin D 3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. Br J Nutr. 2012;108(8):1410-8.

200. Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. J Hepatol. 2014;60(4):824-31.

201. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. Glob Adv Health Med. 2014;3(3):58-69.

202. Zhou L, Zhang J, Fang Q, Liu M, Liu X, Jia W, Dong LQ, Liu F. Autophagy-mediated insulin receptor down-regulation contributes to endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance. Mol Pharmacol. 2009;76(3):596-603.

203. Tavares MFM, 2017. Hoffman, Jessica M., et al. Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, D rosophila melanogaster. *Aging Cell* 13.4 (2014): 596-604.

204. Boja, Emily S., and Henry Rodriguez. The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *The Korean journal of laboratory medicine* 31.2 (2011): 61-71.

Apêndices

Apêndice A – Publicação sobre o perfil de ácidos biliares após DGYR e sua associação com a remissão do diabetes tipo 2 em mulheres obesas

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 1/7

Clinical Nutrition xxx (xxxx) xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/clnu

Original article

Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study

Camila de Siqueira Cardinelli [a,*], Raquel Susana Torrinhas [a], Priscila Sala [a], Marcos Albieri Pudenzi [b], Célio Fernando F Angolini [b], Mariane Marques da Silva [a], Natasha Mendonça Machado [a], Graziela Ravacci [a], Marcos N. Eberlin [b], Dan L. Waitzberg [a]

[a] Laboratory of Nutrition and Surgery Metabolic of the Digestive Tract, Metanutri – Lim 35, Department of Gastroenterology, University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil

[b] ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 September 2018
Accepted 26 December 2018

Keywords:
Fecal bile acids
Bariatric surgery
Type 2 diabetes

SUMMARY

Objective: To assess the influence of Roux-en-Y gastric by-pass (RYGB) on fecal bile acid (BA) profile and its relationship with postoperative remission of type 2 diabetes (T2D).

Methods: Fecal samples were collected 3 and 12 months after RYGB from diabetic obese women who were responsive (n = 12) and non-responsive (n = 8) to postoperative remission of T2D. Fecal BA profile was accessed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in a targeted approach.

Results: Relative to pre-operative levels, a total of 10 fecal BA profiles decreased after RYGB (ANOVA, $p \leq 0.05$) with significant fold-changes for glycochenodeoxycholic, glycocholic, taurocholic, and tauroch enodeoxycholic acids at 3-months postoperatively, and for glycochenodeoxycholic, glycocholic and taurocholic acids at 12 months postoperatively (Benjamini–Hochberg, $p \leq 0.05$). Postoperative changes in fecal BA were different between responsive and non-responsive women, with a significant reduction in more sub-fractions of BA in responsive women than in non-responsive women, and a marked difference in the temporal behavior of cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), thus reflecting changes in CA/CDCA ratio, and tauroursodeoxycolic (TUDCA) levels between these responsiveness groups (ANOVA, $p \leq 0.05$).

Conclusion: RYGB induces a marked reduction in the concentration of fecal BA, which is heterogeneous according to T2D responsiveness.

© 2018 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Bile acids (BAs) are a diverse group of amphipathic steroid molecules that enable micelle formation and facilitate intestinal absorption, emulsification, and transport of nutrients, lipids, and lipophilic vitamins [1]. Primary BAs are derived from catabolism of cholesterol in hepatocytes and can be bio-transformed into secondary BA in the intestine by its resident bacteria [2–4].

Recently, BAs were also recognized as a potent signaling molecules implicating pleiotropic physiological responses which includes glucose and energy metabolism by binding to specific receptors [5]. BAs have been shown to regulate glucose homeostasis by activating Farnesoid X receptor (FXR)-mediated pathways and by binding to membrane G-protein coupled bile acid receptor 1 (TGR5) in the intestine [6]. The experimental induction of FXR activation significantly reduced blood glucose levels in diabetic db/db and wild-type mice, while FXR-null mice exhibited both glucose intolerance and insulin insensitivity [7]. Experimental data also suggest that the activation of TGR5 can improve pancreatic function and glucose tolerance by stimulate intestinal glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion [8,9].

The gastric bypass procedure modifies the anatomical location at which bile enters the upper gastrointestinal tract via the biliopancreatic limb of the Roux-en-Y (RYGB) construction and increases primary and secondary serum BAs levels in both human

* Corresponding author. Av. Dr. Arnaldo, 455, 2 andar, sala 2208 – Cerqueira César, CEP: 01246-903, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3061 7459.
E-mail address: camilacardinelli@yahoo.com.br (C. de Siqueira Cardinelli).

https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028
0261-5614/i0 2018 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 2/7

and animal models [10–12]. Specifically in animal models, a targeted ultra-performance liquid-chromatography (UPLC)-MS method of fecal samples detected decreased faecal bile acids after RYGB. This modulation of BAs may trigger the improved glucose regulation, suggesting a potential metabolic role for BA after bariatric surgery, including the remission of type 2 diabetes (T2D) [2–4]. In this scenario, it would be expected that the fecal BAs profile would reflect both healthy and unhealthy conditions [13]. Our present preliminary study aimed to investigate whether fecal BAs profile after RYGB is associated with the post-operative remission of T2D in obese women.

2. Methods

2.1. Ethical issues

This preliminary study is part of the SURmetaGIT trial [14], registered at www.ClinicalTrials.gov (NCT01251016) and its specific protocol was approved by the local ethics Committee (Reference: CAPPesq 1011/09). All protocol interventions were performed according to the ethical standards of the World Medical Association's Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient prior to trial participation.

2.2. Subjects

Obese T2D women (n = 20), who were candidates for RYGB, were recruited from the Surgical Gastroenterology Department of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo School of Medicine between February 2011 and December 2014. Our inclusion criteria were as follows: adults (18–60 years); body mass index (BMI) ≥ 35 kg/m^2; proven T2D diagnosis (fasting glucose ≥ 126 mg/dL and glycated hemoglobin ≥6.5%) and/or use of oral antidiabetic drugs. Our exclusion criteria were as follows: *Helicobacter pylori* infection, diagnosis of thyroid or hepatic diseases; antibiotic use in the month preceding fecal sample collection; probiotic and prebiotic use, current or recent participation in another interventional study protocol.

2.3. Preliminary study design

All patients were submitted to standardized open RYGB without silicon rings with biliary-pancreatic loops (50–60 cm) and feed handles (100–120 cm). The fecal metabolome profile was then determined in all patients 3 months and 12 months after RYGB. Data on fecal BA were then correlated with post-operative T2D remission.

2.4. Fecal sample collection and processing

All patients collected their own fecal samples at home using a specific specimen collection system (Commode Specimen; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). The fecal samples were then frozen at −20 °C and transported to our laboratory by a motorcycle courier service, specialized in the transport of biological samples under controlled temperature. At our laboratory, fecal samples were aliquoted (100 mg) in cryogenic vials (Kasvi, Canada) without thawing and stored at −80 °C to await metabolomic evaluations. The fecal aliquots were sent to Biocrates (Innsbruck, Austria) under controlled temperature, under the care of the carrier World Courier (São Paulo, Brazil). There, fecal BAs were obtained using 340 ml ethanol (HPLC grade, Merck, Germany) and 60 ml phosphate buffer (20 mM, Merck, Germany) in a seven step procedure: 1. Ethanol addition and 3 min vortex mixing; 2. Buffer addition and manual homogenization; 3. Centrifugation (200 rpm, 30 min, 0 °C); 4. Sonication (70 W, 5 min, 0 °C); 5. Centrifugation (800G, 10 min, 0 °C); 5. Transfer of supernatant into a reaction tube (Eppendorf, Germany); 6. centrifugation (19,000 G, 10 min, 4 °C) and 7. transfer of supernatant into a second reaction tube and freezing (−80 °C).

2.5. Assessment of fecal BA

Fecal BAs were assessed by electrospray (ESI) mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC) with a tandem mass spectrometry (MS/MS) instrument (AB SCIEX, ThermoScientific, Waters) using a kit customized by Biocrates® (Biocrates® Bile Acids Kit), which enabled the absolute quantification of up to 20 different BA. A highly selective reverse phase analysis method, mass spectrometry coupled with liquid chromatography (CL-MS/MS), in negative detection mode (multiple reaction monitoring, MRM), was then applied to determine the concentrations of BA. For high precision quantification, we ensured that internal standards and external calibration were applied.

2.6. Assessment of T2D remission

One year after the surgical procedure, patients were divided into two sub-groups, according to the presence (the responsive group) or absence (the non-responsive group) of T2D remission. The remission of T2D was assessed by applying the following criteria from the American Diabetes Association (ADA): complete remission – fasting glycemia <100 mg/dL, HBA1c <42.1 mmol/mol, under the absence of oral antidiabetic medication or other antidiabetic procedures for at least one year [15].

2.7. Statistical analysis

Biocrates MetIDQ™ software (Innsbruck, Austria) was applied to export the fecal BA data, along with the online platform MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca) [16,17]. Metabolites which were >20% of values below the limit of detection (LOD) were removed from our analysis. The concentrations of BAs were normalized to fecal sample weight and given in pmol/mg feces. Selected metabolite sums and ratios were calculated and tested in addition to single analytes. Using R software (version 3.2.2; R Core Team, Vienna, Austria) [18], measures of central tendency and of dispersion were tested by analysis of variance (ANOVA) and by the Benjamini–Hochberg method for multiple testing [19] and data were compared by ANOVA between responsive and non-responsive women.

3. Results

3.1. Sample

From the 20 patients studied, 12 (60%) were responsive and 8 were non-responsive for one year T2D remission, although one responsive patient moved out of town and did not complete the follow-up protocol to the 12-month time-point (Fig. 1). Descriptive data for the responsive and non-responsive patients were previously reported and here are described in supplementary table 1. A main point to highlight from these reported data is that circulating levels of glucose, insulin, C-peptide, and HbA1c did not differ significantly between responsive and non-responsive patients at baseline (Supplementary table 1, $p > 0.05$). Furthermore, there was no significant difference in the amount of weight lost at 3 months and 12 months post-operatively when compared between groups (Supplementary table 1, $p > 0.05$).

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 3/7

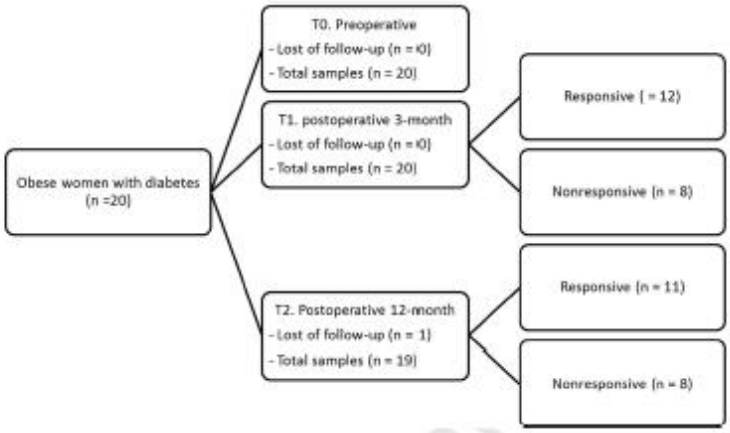


Fig. 1. Flowchart of patient distribution among pre- and post-operative periods, and groups, in relation to the postoperative remission of type 2 diabetes. Fecal samples were collected from the same obese patients prior to and after bariatric surgery.

3.2. RYGB induced a rapid reduction in fecal BAs that persisted until one year postoperatively

Across the preliminary study participants, a total of 10 fecal BAs changed after RYGB (Fig. 2). Levels of all of these 10 BAs were significantly reduced in relation to their pre-operative levels (Fig. 2). Analysis of fold-changes confirmed a reduction in the levels of glycochenodeoxycholic (GCDCA), glycocholic (GCA), taurocholic acid (TCA), and taurochenodeoxycholic (TCDCA) acids at 3-months post-operatively ($p \leq 0.05$, Fig. 3). Of these, GCDCA, GCA, and TCA remained significantly reduced when tested 12 months after RYGB (Fig. 3). The Fig. 4 illustrate the changes in fecal bile acid levels in obese women after Roux-en-Y gastric bypass, according to the flowchart of its synthesis from cholesterol. We did not observe significant changes in fecal BAs levels between 3- and 12-month postoperative periods (Table 1; $p > 0.05$).

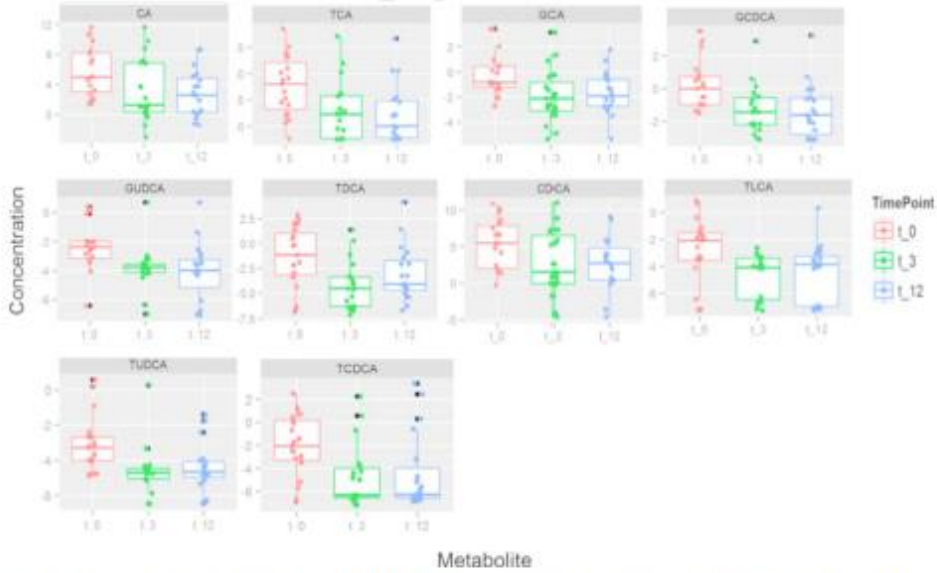


Fig. 2. Box plots of single BAs metabolites, significantly altered ($p < 0.05$) in the 3 time point (before bariatric surgery (t_0), 3 and 12 months after surgery (t_3, t_12)) according to ANOVA using a paired test. Outliers are highlighted by an additional black dot next to the original data point. Data is log2 transformed. Primary bile acids: (CA) Cholic acid; (CDCA) Chenodeoxycholic acid; (GCA) Glycocholic acid; (GCDCA) Glycochenodeoxycholic acid; (TCA) Taurocholic acid; (TCDCA) Taurochenodeoxycholic acid. Secondary bile acids: (GUDCA) Glycoursodeoxycholic acid; (TLCA) Taurolithocholic acid; (TDCA) Taurodeoxycholic acid; (TUDCA) Tauroursodeoxycholic acid.

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 4/7

UNIVARIATE ANALYSIS

Fold Change Analysis (Single metabolites)

Fold change (Before vs 3 months after bariatric surgery)

METABOLITE	FC_t0_t3	qVal_t0_t3
GCDCA	-1.454854915	0.022453021
GCA	-1.682247422	0.022453021
TCA	-2.430811252	0.036111541
TCDA	-2.695841205	0.036111541

Fold change (Before vs 12 months after bariatric surgery)

METABOLITE	FC_t0_t12	qVal_t0_t12
GCDCA	-1.577429593	0.021887366
GCA	-1.490994189	0.023347004
TCA	-2.722670775	0.030419994

Fig. 3. Fold changes in single metabolites upon bariatric surgery. Fold changes were calculated for each patient individually, followed by calculating the mean fold change for each metabolite. Negative values represent a decrease in concentration. Only metabolites with significant alterations are listed. Threshold for significance was set at 0.05 after correction for multiple testing using Benjamini–Hochberg. Primary bile acids: (GCDCA) Glycochenodeoxycholic acid; (GCA) Glycocholic acid; (TCA) Taurocholic acid; (TCDCA) Taurochenodeoxycholic acid.

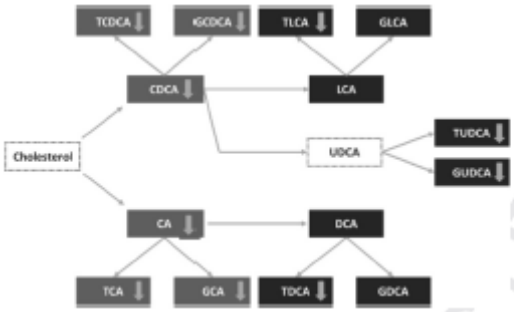


Fig. 4. Changes in fecal bile acid levels in obese women after Roux-en-Y gastric bypass, according to the flowchart of its synthesis from cholesterol. Primary bile acids are highlighted in the grey box and secondary bile acids in the dark box. Metabolites in dashed lines were not considered for statistical analysis as they were not measured (cholesterol) or did not meet quality criteria (UDCA). Significant reductions in metabolite levels in fecal samples after bariatric surgery according to multiple testing corrected ANOVA are indicated by the black arrows. No significant elevations were observed. Primary bile acids: cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA)/Primary bile acids conjugated: taurocholic acid (TCA), glicocholic acid (GCA), TCDCA, taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) and glicochenodeoxycholic acid (GCDCA)/Secondary bile acids: deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA)/Secondary bile acids conjugated: taurolithocholic acid (TLCA), glicodeoxycholic acid (GLCA), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), glicoursodeoxycholic acid (GUDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA) and taurodeoxycholic acid (TDCA).

Table 1
Fold changes of fecal bile acids in obese women 3 months and 12 months after Roux-en-Y gastric bypass in comparison to preoperative levels.

Bile acid sub-fraction	Postoperative time-point			
	3-month		12-month	
	FC	p value	FC	p value
Glycochenodeoxycholic acid (GCDCA)	−1.45	0.022	−1.57	0.021
Glycocholic acid (GCA)	−1.68	0.022	−1.49	0.023
Taurocholic acid (TCA)	−2.43	0.036	−2.73	0.030
Taurochenodeoxycholic acid (TCDCA)	−2.69	0.036	–	–

Fold changes (FC) were calculated for each patient individually, followed by calculation of the mean fold change for each metabolite. Negative values represent a reduction in concentration. Only metabolites with significant alterations are listed, all of these were primary conjugated bile acids. No significant changes were found for the concentration of fecal bile acids when compared between 3 and 12 months postoperatively. The threshold for significance was set at 0.05 after correction for multiple testing using the Benjamini–Hochberg test statistical for controlling the false discovery rate.

3.3. Distinct fecal BAs sub-fractions decreased after RYGB in responsive and non-responsive patients

We observed reduced fecal levels of deoxycholic acid (DCA), glicodeoxycholic acid (GDCA), glicolithocholic acid (GLCA), glicoursodeoxycholic acid (GUDCA) lithocholic acid (LCA) taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), taurodeoxycholic acid (TDCA), taurolithocholic acid (TLCA), and changes in cholic acid (CA), and chenodeoxycholic acid (CDCA), expressed by an increase in the CA/CDCA ratio, at 3-months post-operatively in responsive patients ($p \leq 0.05$; Table 2). Of these BAs, only GUDCA remained at reduced levels when tested 12 months postoperatively and compared to preoperative levels. Only GLCA and LCA showed significant increases when compared between postoperative timepoints (3-months *vs.* 12-months, $p \leq 0.05$). Furthermore, 12-months postoperatively, responsive patients showed a reduction in GCDCA and TUDCA when compared to preoperative levels ($p \leq 0.05$).

In contrast to the responsive patients, few changes were observed in the fecal BA levels of non-responsive patients after RYGB (Table 3). In non-responsive patients, GCDCA and TCA were respectively reduced at 3 and 12 months postoperatively when compared to basal levels. As with the responsive patients, CA/CDCA ratio also increased in non-responsive patients after RYGB, but this change occurred latter and was observed at 12 months post-operatively compared to 3 months postoperatively, but not with the preoperative period ($p \leq 0.05$).

3.4. Surgically-induced changes in the behavior of fecal CA/CDCA ratio and TUDCA levels were associated with post-operative T2D remission

By comparing the variation (Δ) of BA levels among the studied time-points, it was evident that ΔCA/CDCA from the preoperative stage to 3 months postoperatively was significantly different when compared between the responsiveness groups ($p = 0.0001$, Fig. 5A) due to an increase in responsive patients and a reduction in non-responsive patients; the opposite trend occurred when comparing ΔCA/CDCA from 3 to 12 month time-points ($p = 0.0001$, Fig. 5B). Furthermore, the ΔTUDCA from the preoperative stage to 12 months postoperatively was also significantly different between the responsiveness groups ($p = 0.0327$, Fig. 5C) due to a reduction only in responsive patients. ANOVA showed that these postoperative changes in the behavior of fecal CA/CDCA ratio and TUDCA levels were able to distinguish between responsive from non-responsive patients ($p \leq 0.05$).

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 6/7

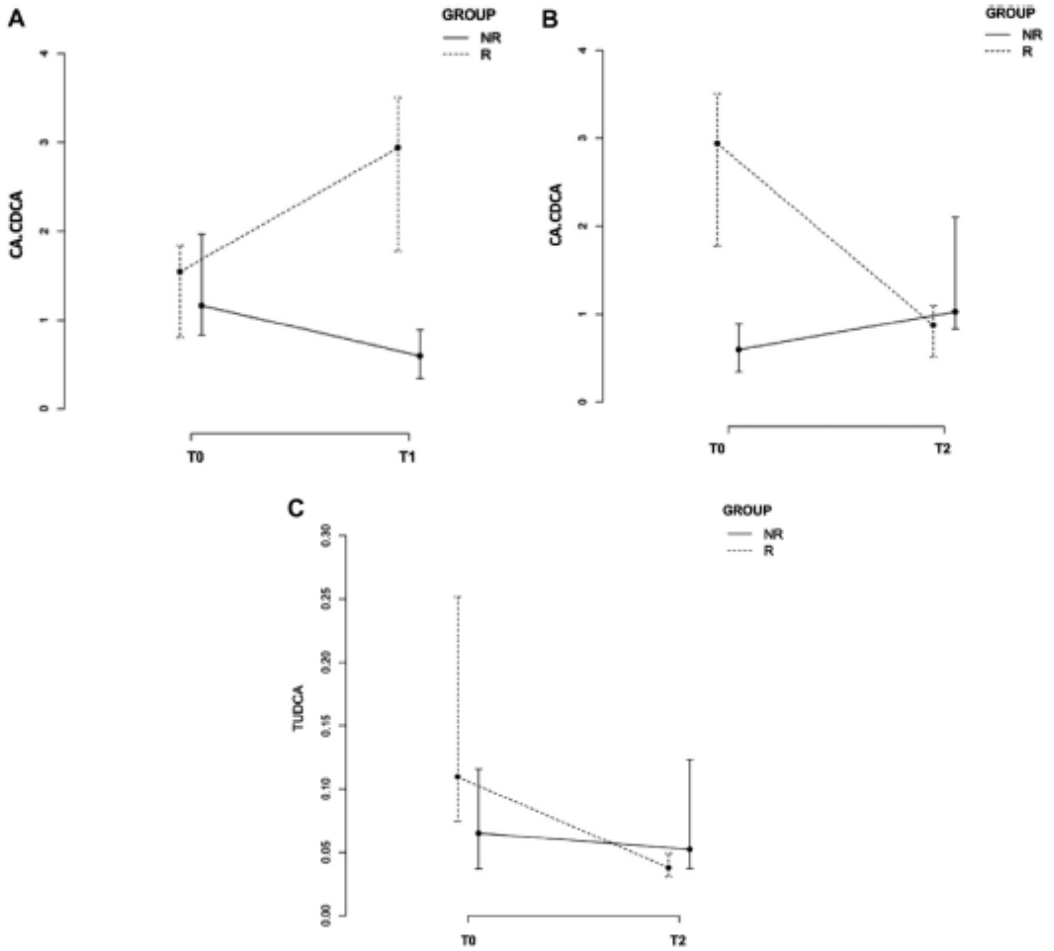


Fig. 5. **A.** Changes in CA/CDCA ratio behavior among obese women responsive (R) and non-responsive (NR) for the remission of type 2 diabetes 3 months after Roux-en-Y gastric bypass. Responsive patients presented with increased, and non-responsive patients presented with decreased, cholic acid (CA)/chenodeoxycholic acid (CDCA) ratio 3 months postoperatively (ANOVA $p = 0.0001$). T0, preoperative; T1, postoperative 3-month; **B.** Changes in CA/CDCA ratio behavior among obese women responsive (R) and non-responsive (NR) for the remission of type 2 diabetes 12 months after Roux-en-Y gastric bypass. The opposite effect was found for cholic acid (CA)/chenodeoxycholic acid (CDCA) ratio at 12 months postoperatively compared with the period at 3 months postoperatively (ANOVA, $p = 0.0001$). Responsive patients presented decreased, and non-responsive patients presented increased a at 12 months postoperatively. T0, postoperative 3-month; T2, postoperative 12-month. **C.** Changes in TUDCA levels among obese women responsive (R) and non-responsive (NR) for the remission of type 2 diabetes 12 months after Roux-en-Y gastric bypass. Only responsive patients presented with a statistically significant reduction in the levels of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) at 12 months postoperatively (ANOVA, $p = 0.0327$). T0, preoperative; T2, postoperative 12-month.

liver, and/or absorption of TUDCA in the intestine, could be reflected in the feces of our responsive patients and may suggest a potential effect upon T2D remission.

It is worth noting that as RYGB restricts the stomach size, our patients had significantly reduced their fat intake [37], thereby favoring a reduced level of BAs redirection to the intestine for emulsification. However, the specific BA profile found in responsive and nonresponsive patients in relation to T2D remission, highlights the modulation of BAs by RYGB beyond restrictive intake.

Our preliminary study has some limitations which need to be taken into consideration. For example, we did not investigate changes in fecal BAs associated with the gut microbiota profile and systemic BA levels. Nevertheless, changes in the composition and richness of the gut microbiota have been commonly reported after RYGB and our data is coherent with increased levels of circulating BAs reported previously in patients undergoing this procedure [38–40]. We also evaluated only obese diabetic women and our findings may not be generalized to clinically-matching males. In our Surgical Division women are more prevalent than men among the bariatric patients and by including only one gender we were able to study a more homogeny sample.

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

ARTICLE IN PRESS YCLNU3730_proof ■ 28 January 2019 ■ 5/7

Table 2
Changes in BAs concentration among obese women responsive for the remission of type 2 diabetes 3 and 12 months after Roux-en-Y gastric bypass.

Variable	T0	T1	T2	T0 vs. T1	T0 vs. T2	T1 vs. T2
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	p value	p value	p value
CA/CDCA	1.51 ± 0.84	3.06 ± 2.04	1999.09 ± 1325.68	0.010	0.206	0.102
DCA	2791.67 ± 2469.78	1393.2 ± 1923.81	1773.09 ± 1371.79	0.042	0.173	0.093
GDCA	3.34 ± 2.68	1.57 ± 1.95	1.89 ± 0.82	0.007	0.102	0.067
GLCA	0.53 ± 0.49	0.26 ± 0.27	0.37 ± 0.19	0.012	0.320	0.032
GUDCA	0.32 ± 0.42	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.016	0.007	0.634
LCA	1154.53 ± 1168.66	515.95 ± 565.97	760.36 ± 463.9	0.027	0.413	0.014
TCDCA	1.05 ± 1.68	0.16 ± 0.42	0.51 ± 1.65	0.042	0.083	0.700
TDCA	1.66 ± 1.87	0.20 ± 0.37	1.76 ± 5.28	0.007	0.102	0.175
TLCA	0.41 ± 0.50	0.08 ± 0.07	0.17 ± 0.36	0.003	0.054	0.765
GCDCA	2.27 ± 3.51	0,56 ± 0,61	0.38 ± 0.29	0.092	0.005	0.831
TUDCA	0,33 ± 0,48	0,03 ± 0,01	0.05 ± 0.05	0.001	0.001	0.520

Key: T0, preoperative; T1, postoperative 3-month; T2, postoperative 12-month; SD, standard deviation; CA/CDCA ratio of cholic and chenodeoxycholic acids; DCA, deoxycholic acid, GDCA, glicodeoxycholic acid; GLCA, glicolithocholic acid; GUDCA, glicoursodeoxycholic acid; LCA, lithocholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA; taurodeoxycholic acid; TLCA, taurolithocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA).

Table 3
Changes in bile acid concentration among obese women who were non-responsive for the remission of type 2 diabetes 3 and 12 months after Roux-en-Y gastric bypass.

Variable	T0	T1	T2	T0 vs. T1	T0 vs. T2	T1 vs. T2
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	p value	p value	p value
CA/CDCA	1.59 ± 1.14	0.171 ± 0.47	3.54 ± 6.01	0.055	0.945	0.039
TCA	1.00 ± 1.45	1.62 ± 4.18	0.37 ± 0.54	0.641	0.016	1000
GCDCA	1.99 ± 2.44	1.44 ± 2.52	1.42 ± 2.52	0.008	0.250	0.742

Key: T0, preoperative; T1, postoperative 3-month; T2, postoperative 12-month; SD, standard deviation; CA/CDCA ratio of cholic and chenodeoxycholic acids; TCA, taurocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid.

4. Discussion

This preliminary study showed, for the first time, changes in fecal BAs profiles in obese women with T2D in response to RYGB. These changes were marked by an early reduction in primary and secondary BAs concentrations that persisted until one-year after surgery. The postoperative profile of BAs differed between patients with or without T2D remission, suggesting a potential link between BAs metabolism and glucose homeostasis [20–23].

A reduction in total fecal BAs and their sub-fractions CDCA, CA, LCA, DCA and ursodeoxycholic acid (UDCA), has been reported in animal models after RYGB [12,24–27]. In our preliminary study of diabetic women, significant reduction in the levels of fecal BAs also occurred after RYGB, mainly in those BAs conjugated to glycine and taurine. Conjugated BAs can be deconjugated by the intestinal microbiota, specifically by bile salt hydrolases (BSH) synthesized mainly by *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* [2]. The deconjugation of BAs by BSH activity accelerates cholesterol catabolism by increasing the elimination of fecal BA [5]. Therefore, our data suggest that the loss of fecal BAs may be decreased by a reduction of its deconjugation by gut bacteria after RYGB and/or may reflect the increased hepatic conjugation of primary BA following the surgical procedure.

The observed reduction in the elimination of fecal BAs following RYGB may reflect its increased absorption and recirculation through the enterohepatic pathway. This agrees with the increased levels of circulating BAs reported after the procedure in human and animal models, which have been considered to represent a metabolic mechanism that influences post-operative glycemic homeostasis [10–12]. Activation of the LXR/RXR pathway in gut has been associated with increased BAs absorption and enterohepatic recirculation [28]. An ongoing study from our group demonstrated that RYGB increased the expression of genes that promote activation of the LXR/RXR pathway in the jejunum of responding patients. These data suggested that the decrease in fecal AB may have occurred due to the increase in its recirculation and that this metabolic pathway may have been important for glycemic homeostasis.

Therefore, it could be expected that changes in the levels of fecal BAs would affect post-operative remission of T2D in our patients. In our preliminary study, more BAs sub-fractions were reduced in responsive than non-responsive patients. Furthermore, changes in the CA/CDCA ratio and levels of TUDCA were quite distinct between these groups of patients.

Enhanced plasma CA/CDCA ratios are commonly observed during cholestasis, a clinical condition characterized by a reduction or cessation of bile formation or flow. For example, cholestatic hamsters exhibit a significant increase in serum CA/CDCA ratio, and a reduced proportion of unconjugated BA to total BA, via a mechanism associated with the inhibition of the mitochondrial sterol 27-hydroxylase pathway (CYP27A1) [29]. These changes in the pool of BA may therefore be considered as negative predictors of liver function and BA synthesis.

In our preliminary study, increased fecal CA/CDCA ratio observed in responsive patients at early postoperative stage can reflect lower CA and higher CDCA absorption in the intestine, potentially resulting in a lower circulating CA/CDCA ratio following RYGB. Furthermore, responsive patients showed a reduction in high sub-fraction types of conjugated fecal BA than non-responsive patients, suggesting a higher absorption of conjugated BA in the intestine [30].

The higher fecal CA/CDCA ratio observed in the early post-operative (3-month) stage in responsive patients may also reflect an increased CA and/or decreased CDCA production in the liver, but this is less likely to be consistent with the control of glycemic homeostasis. An increased circulating CA/CDCA ratio is also observed in pregnant women with intrahepatic cholestasis, and is associated with increased fasting triglycerides and reduced levels of HDL cholesterol (similar to changes observed in metabolic syndrome), and increased blood glucose, compared to healthy pregnant women [29–32]. Furthermore, Kimura et al. (1991) found an abnormally low CA/CDCA ratio in pediatric patients with cholestasis presenting with severe hypoglycemia [33]. Taken together, these findings suggest that a high circulating CA/CDCA ratio favors hyperglycemia, while patients with a low circulating CA/CDCA ratio are prone to hypoglycemia.

In our present preliminary study, decreased levels of fecal TUDCA were also a hallmark of responsiveness to T2D remission during the late postoperative stage (12-month). TUDCA is a taurine-conjugated form of UDCA, a BA approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of cholestatic liver disease [34]. Improved insulin sensitivity and pancreatic beta cell islets restoration via the AMP/PKA pathway, have been reported after treatment with oral TUDCA [35,36]. Both increased synthesis in the

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

Taken together, our data displayed a distinct influence of RYGB on fecal BA pattern between obese women responsive and non-responsive to T2D remission. Postoperative fecal BA pattern in responsive women seems to reflect an early increase in circulating levels of TUDCA and CA/CDCA ratios, which together can be suggestive of an improvement in glycemic homeostasis. Why non-responsive women did not follow this protective pattern is beyond the scope of our present preliminary study. We can conclude that RYGB induces a marked reduction in the concentration of fecal BA concentration, which is heterogeneous according to T2D responsiveness.

Conflict of interest

None.

Funding

This preliminary study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/09612-3 and 2014/05220-1), and received a grant from Nestlé Health Science for the development of the target metabolomic analyses.

CRediT authorship contribution statement

Camila de Siqueira Cardinelli: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Raquel Susana Torrinhas:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Priscila Sala:** Resources, Funding acquisition. **Marcos Albieri Pudenzi:** Methodology. **Célio Fernando F Angolini:** Formal analysis. **Mariane Marques da Silva:** Resources. **Natasha Mendonça Machado:** Resources. **Graziela Ravacci:** Writing - review & editing. **Marcos N. Eberlin:** Supervision. **Dan L. Waitzberg:** Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Project administration.

Acknowledgements

The authors thank the patients who participated in the study and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Nestlé Health Science.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028.

References

[1] de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. Cell Metabol 2013;17:657–69.
[2] Li T, Udayan A. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. Adv Pharmacol 2015;74:263–302.
[3] Wahlström A, Sayin SI, Marschall H, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. Cell Metabol 2016;24:41–50.
[4] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon P, et al. Bile acids and the gut microbiome. Curr Opin Gasterenterol 2014;30:332.
[5] Fiorucci S, Distrutti E. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. Trends Mol Med 2015;21:702–14.
[6] Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling. Comp Physiol 2013;3:1191–212.
[7] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:1006–11.
[8] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. Cell Metabol 2009;10:167–77.
[9] Kumar DP, Asgharpour A, Mirshahi F, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 modulates pancreatic islet β cells to promote glucose homeostasis. J Biol Chem 2016. jbc – M115.
[10] Kohli R, Bradley D, Setchell KD, et al. Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. J Clin Endocrinol Metabol 2013;98:E708–12.
[11] Steinert RE, Peterli R, Keller S, et al. Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: a 1-year prospective randomized pilot trial. Obesity (Silver Spring) 2013;21:E660–8.
[12] Bhutta HY, Rajpal N, White W, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on bile acid metabolism in normal and obese diabetic rats. PLoS One 2015;10, e0122273.
[13] Ocvirk S, O'Keefe Stephen JD. Influence of bile acids on colorectal cancer risk: potential mechanisms mediated by diet-gut microbiota interactions. Curr Nutr Rep 2017;6:315–22.
[14] Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. The SURMetaGIT study: design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. J Int Med Res 2016;44:1359–75.
[15] Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, et al. How do we define cure of diabetes? Diabetes Care 2009;32:2133–5.
[16] Ramsay SL, Stoegg WM, Weinberger KM, et al. Apparatus and method for analyzing a metabolite profile. U.S. Patent No. 8,265,877. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2012.
[17] Xia J, Psychogios N, Young N, et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Res 2009;37:W652–60.
[18] Team, R. Core. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
[19] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Roy Stat Soc B 1995;57:289–300.
[20] Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. Ann Intern Med 2005;142:547–59.
[21] Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. Ann Surg 2003;238:467–84.
[22] Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. JAMA 2004;292:1724–37.
[23] Pories W, Swanson M, MacDonald K, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. Ann Surg 1995;222:339–52.
[24] Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. J Lipid Res 2009;50:1955–66.
[25] Nagengast FM, Grubben MJAL, Van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. Eur J Cancer 1995;31:1067–70.
[26] Nie Y, Hu J, Yan X. Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health. J Zhejiang Univ Sci B 2015;16:436–46.
[27] Lindqvist A, Ekelund M, Garcia-Vaz E, et al. The impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on normal metabolism in a porcine model. PLoS One 2017;12, e0173137.
[28] Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. J Hepatol 2013;58(1):155–68.
[29] Matsuzaki Y, Bouscarel B, Ikegami T, et al. Selective inhibition of CYP27A1 and of chenodeoxycholic acid synthesis in cholestatic hamster liver. Biochim Biophys Acta 2002;1588:139–48.
[30] Pires MJ, Colaço AO. The role of bile acids in the pathology and therapy of hepatic diseases in dog and cat. RCPV 2004;99:137–43.
[31] Jurate K, Rimantas Z, Jolanta S, et al. Sensitivity and specificity of biochemical tests for diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. Ann Hepatol 2017;16:569–73.
[32] Martineau MG, Raker C, Dixon PH, et al. The metabolic profile of intrahepatic cholestasis of pregnancy is associated with impaired glucose tolerance, dyslipidemia, and increased fetal growth. Diabetes Care 2015;38:243–8.
[33] Kimura A, Yuge K, Yukizane S, et al. Abnormal low ratio of cholic acid to chenodeoxycholic acid in a cholestatic infant with severe hypoglycemia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1991;12:383–7.
[34] Paridaens A, Raevens S, Devisscher L, et al. Modulation of the unfolded protein response by tauroursodeoxycholic acid counteracts apoptotic cell death and fibrosis in a mouse model for secondary biliary liver fibrosis. Int J Mol Sci 2017;18:214.
[35] Kars M, Yang L, Gregor MF, et al. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. Diabetes 2010;59:1899–905.
[36] Lee YY, Hong SH, Lee YJ, et al. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. Biochem Biophys Res Commun 2010;397:735–9.
[37] da Silva MM, Sala PC, Torrinhas RS, et al. The efficiency of 24-hour food recall for assessing nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. Nutr Hosp 2014;30:1240–7.
[38] Risstad H, Kristinsson JA, Fagerland MW, et al. Bile acid profiles over 5 years after gastric bypass and duodenal switch: results from a randomized clinical trial. Surg Obes Relat Dis 2017;13:1544–53.
[39] Graessler J, Qin Y, Zhong H, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. Pharmacogenomics J 2013;13:514–22.
[40] Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. Am J Clin Nutr 2013;98:16–24.

Please cite this article as: de Siqueira Cardinelli C et al., Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study, Clinical Nutrition, https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.028

Apêndice B – Produção cientifica do doutorado

Lista de publicações

de Siqueira Cardinelli, C., Torrinhas, R. S., Sala, P., Pudenzi, M. A., Angolini, C. F. F., da Silva, M. M., ... & Waitzberg, D. L. (2019). Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: A preliminary study. *Clinical Nutrition*.

Al-Assal, K., Martinez, A. C., Torrinhas, R. S., **Cardinelli, C**., & Waitzberg, D. (2018). Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental*, *20*, 60-64.

Belarmino, G., Singer, P., Gonzalez, M. C., Machado, N. M., **Cardinelli, C. S**., Barcelos, S., ... & Pereira, R. M. R. (2018). Prognostic value of energy expenditure and respiratory quotient measuring in patients with liver cirrhosis. *Clinical Nutrition*.

Sala, P., Belarmino, G., Machado, N. M., **Cardinelli, C. S.**, Al Assal, K., Silva, M. M., ... & Sakai, P. (2016). The SURMetaGIT study: design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Journal of International Medical Research*, *44*(6), 1359-1375.

Cardinelli, C. S., Sala, P. C., Alves, C. C., Torrinhas, R. S., & Waitzberg, D. L. (2015). Influence of intestinal microbiota on body weight gain: a narrative review of the literature. *Obesity surgery*, *25*(2), 346-353.

Marques M, Sala PC, **Cardinelli CS**, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Comparison of virtual nutri plus® and dietpro 5i® software systems for the assessment of nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. Clinics. 2014;69(11):714-722. DOI: 10.6061/clinics/2014(11)02.