KARINA AL ASSAL

**Análise da microbiota fecal em pacientes obesas graves
portadores de diabetes mellitus do tipo 2 submetidos à
derivação gástrica em Y de *Roux***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dan Linetzky Waitzberg

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Al Assal, Karina

Análise da microbiota fecal em pacientes obesas graves portadores de diabetes mellitus do tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux / Karina Al Assal. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Obesidade 2.Microbioma gastrointestinal 3.Bactérias 4.Diabetes mellitus tipo 2 5.Derivação gástrica 6.RNA ribossômico 16S 7.Genes

USP/FM/DBD-266/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos aqueles que dedicam suas vidas para cuidar da saúde dos outros, A Deus, Universo ou qualquer força maior que colocou no meu caminho estudar esse tema

*Aos meus pais **Mary Lúcia e Claudio Al Assal** que tanto investiram na minha educação e me ensinaram que o conhecimento é o nosso bem mais precioso, graças ao amor incondicional e apoio que sempre tive, pude sonhar mais alto.*

*Ao meu amor **Ivan Macedo Melo Filho**, que sem você certamente não teria chegado até aqui, que pacientemente enxugou minhas lágrimas em momentos de desespero e vibrou junto a cada conquista, sempre acreditou em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, que eu seria capaz. Agradeço pelo companheirismo, por sonhar meus sonhos, por me inspirar, me ajudar e me encorajar a ser cada dia melhor. Te amo.*

*Aos meus irmãos **Daniel e Fernando Al Assal** que sempre vibram comigo a cada conquista e certamente essa será mais uma.*

*À **Francisco, Tereza e Katarina**, pela companhia nas incansáveis tardes de estudo e sempre me apoiando com um olhar incentivador.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer especialmente àquele que desde o início me motivou e que inúmeras vezes me chamou a atenção para os rumos deste projeto. Sem o **Dr Dan L. Waitzberg**, com seu conhecimento, sua generosidade e sua paciência, não acho que teria concluído o Mestrado. A sua amizade, boas conversas, bons vinhos, a preocupação com que eu conseguisse evoluir e por último, mas não menos importante, pelos seus conselhos que vão além deste trabalho, para a vida. Muito obrigado.

À **Priscila Sala**, por ter coordenado desde o início esse trabalho temático, lembro do dia que atendemos nossa primeira paciente, sempre me ajudou em todas as etapas, aprendi muito com você.

À **Raquel Torrinhas**, por sempre estar disposta a ajudar, não importa o dia e a hora, com seu talento de escrever e interpretar dados, contribuindo com o trabalho de maneira calma e serena.

À **Danielle Fonseca** por ter se tornado uma amiga, pela ajuda sempre e por ter um coração enorme.

Ao **Joel Doré**, por confiar no meu trabalho e por abrir as portas do INRA, que inclusive foi uma experiência incrível.

Ao **Edi Prifit**, por ter paciência de explicar mais de uma vez a mesma análise de bioestatística e por me receber tão bem naquelas tardes frias de Paris.

À **Karine Clement** por ter aberto as portas do ICAN e contribuir com o projeto.

À **Florance Levenez** por ter realizado comigo todos os DNAs e me dado a oportunidade de treinar o meu francês.

Às minhas amigas **Danielle Fontes Almeida** e **Rita Castro**, que foram um grande presente que ganhei durante essa jornada. Não tenho palavras para explicar o quanto vocês foram importantes na minha evolução científica e pessoal. Obrigada pelas intermináveis conversas científicas, filosóficas e espirituais.

À Equipe de Microbiota **Camila Cardeneli**, **Mariane Marques**, **Samira Barcelos** e **Carolina** por dividir nossas angústias e colaborar com nossa pesquisa.

A todos amigos da equipe **Metanutri** que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, seja com algum sorriso, *insights*, conversas e conhecimento.

Aos meus amigos médicos **Marcos Najm**, **Renato Saad**, **Silvio Donatangelo**, **Cristine Lengler**, **Márcia Novaretti**, **Fátima**, que me ensinam diariamente, na vida profissional e pessoal, na nossa mesa redonda.

Às **pacientes** participantes que confiaram em nós e contribuíram para que essa pesquisa se concretizasse, sem elas nada disso seria possível.

Ao **Andrew M. Thomas** por sempre ter uma resposta para minhas dúvidas e me ajudar, por passar uma véspera de natal refazendo a bioinformática.

À **Dra Carla Taddei** por ter aparecido na minha vida na hora certa e no lugar certo, como se fosse um anjo para salvar o sequenciamento das amostras.

Ao Prof. **Dr Sergio Nahas** por ter me apresentado para o mundo acadêmico e pelos ensinamentos e oportunidade de me tornar a profissional que sou hoje.

Aos meus amigos da vida **Ligia Malheiros**, **Marinana De Goeye**, **Paula Fischer**, **Gabriela Boghosian**, **Luisa Bresser**, **Ana Rita Lattes Vezzani**, **Ricardo Honegger**, **Livia Tsukumo** que sempre incentivaram e me escutaram falando sobre a pesquisa e se orgulham de mim e amam me chamar de “Dra. do Coco”.

Normatização adotada

Esta dissertação 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, 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.

Lista de Abreviações

ADA – *American diabetes Association*

AMPk – Adenosina monofosfato quinase

ANOVA – Análise de variância

BP – *Blood Pressure*

ChREBP – Proteínas de ligação ao elemento de resposta ao carboidrato

Cm – Centímetros

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

DGYR – Derivação gástrica em Y de *Roux*

DM2 – Diabétes mellitus do tipo 2

DNA – Ácido dexóxido nucléico

DRI – *Dietary Reference Intake*

E cols –E colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

FDR – *False discovery rate*

FIAF – Fator adipocitário induzido por jejum

g - Grama

Gama-GT – Gama-glutamyltransferase

GCC – Ácidos graxos de cadeia curta

GF – *Germ Free*

GJ – Glicemia de jejum

HbA1C – Hemoglobina glicada

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HOMA2 – *Homeostatic model assessment*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAN – *Institute of Cardiometabolism and Nutrition*

IE – Ingestão de energia relatada

IMC – Índice de massa corporal

LDL-Colesterol – *Low density lipoprotein* (colesterol de baixa densidade)

LIM – Laboratório de investigação médica

LPL –Enzima lipase lipoprotéica

Mg/dL –Miligramas por decilitro

Mm/Hg – Milímetros de mercúrio

Mmol/L – Mili Mol por litro

OMS – Organização Mundial da Saúde

OTU/UTOs – Unidades taxonômicas operacionais

PCA – *Principal component analysis*

PCR – *Polimerase chain reaction*

pH – Potencial de hidrogênio

rF/B – Razão Firmicutes/Bacterioidetes

Rho – Coeficiente de correlação

rRNA – *Ribosomal Ribo-nucleic acid*

RTDM – Remissão total da diabetes mellitus

SREBP1 – Proteínas de ligação ao elemento de resposta ao esterol

SRIE – Sub-relato de ingestão energética

SVM – *Support Vector Machine*

TACO – Tabela brasileira de composição dos alimentos

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TGO – Transaminase glutâmico oxalacética

TGP – Transaminase glutâmico pirúvica

TLR – Receptores *Toll-Like*

TLR4 – Receptor *Toll-Like 4*

TMB – Taxa metabólica basal

UV – Luz ultra-violeta

VLDL-Colesterol – *Very low density lipoprotein* (colesterol de muito baixa densidade)

Lista de Figuras

Figura 1: Prevalência (%) de obesidade, sexo feminino, 2016. Fonte: Adaptado da Organização mundial da saúde (OMS).....	3
Figura 2: Esquema de programação de consultas e procedimentos no período pré-operatório.	20
Figura 3: Esquema de programação de consultas e procedimentos no período pós-operatório.	20
Figura 4: Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR. A: Anatomia normal do trato gastrointestinal. B: Anatomia gastrointestinal alterada após DGYR.....	21
Figura 5: Análise específica do perfil da microbiota intestinal de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) antes e após 3 e 12 meses de DGYR. A: Número de leituras sequenciadas e filtradas para cada amostra. B: Riqueza calculada nos níveis da unidade taxonômica operacional (OTU) versus riqueza calculada no nível do gênero; C: Análise de rarefação dos dados do microbioma no nível do gênero; D: distribuição da razão de Firmicutes para Bacteroidetes (log10), considerando mais pacientes do que os mostrados na Figura 7C (n = 25 para pré-operatório, n = 20 para pós-operatório de 3 meses e n = 14 para pós-operatório de 12- meses).	33
Figura 6: Análise de Spearman de similaridade a nível de Gênero. Horizontal: marrom – pré-operatório, vermelho – pós-operatório 3 meses, amarelo – pós-operatório 12 meses. Vertical: cada cor representa um paciente.	35
Figura 7: Marcadores metabólicos, antropométricos e de ingestão alimentar de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses de DGYR. Dados de marcadores metabólicos no pré-operatório (n=25 verde), pós-operatório 3 meses (n=20, roxo) e pós-operatório 12-meses (n=14, azul) são mostrados: A: Marcadores de composição corporal (peso [kg], índice de massa corporal [kg/m ²], quadril [cm], gordura [%]); B: Prevalência de síndrome metabólica e mudanças em marcadores de resistência a insulina (Insulina de jejum [mU/mL], índice HOMA, e peptídeo C [ng/mL]); C: Metformina (%) e marcadores de ingestão alimentar (Ingestão de energia [cal], carboidrato [g], razão fibra/lipídeo [g]).	43

Figura 8: Perfil da microbiota de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses da DGYR. Dados do perfil da microbiota no pré-operatório (verde), pós-operatório 3 meses (roxo) e pós-operatório 1 ano (azul) são mostrados: **A:** Riqueza de gênero (n=25 para basal, n=20 para pós-operatório 3-meses e n=14 para pós-operatório 12-meses); **B:** Mudanças na microbiota (Análise de PcoA, n=14 para todos os tempos estudados); **C:** Razão firmicutes/bacteroidetes (n=14 para todos os tempos estudados); **D:** Mudanças em gênero para pós-operatório 3 meses vs. pré-operatório (n=20) e para pós-operatório 12 meses. Pré-operatório (n=14).46

Figura 9: Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota em mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses da DGYR. **A:** Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota no pré-operatório, razão fibra/lipídeo. **B:** Ingestão de fibras e riqueza da microbiota no pré-operatório. **C:** Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses, razão fibras/lipídeos. **D:** Ingestão de vitamina B12 e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses. **E:** Ingestão de lipídeos e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses. **F:** Associação entre Ingestão de lipídeos e a riqueza da microbiota no pós-operatório de 12 meses.....48

Figura 10: Perfil de microbiota intestinal de mulheres obesas e portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e relação com ingestão alimentar. Todos os tempos. Branco: ausência da bactéria. Vermelho: presença da bactéria.50

Figura 11: Alteração na microbiota de pacientes com remissão total de diabetes (RTDM) e sem remissão total de diabetes (Sem RTDM) no pré-operatório. Sem RTDM: sem remissão total do diabetes mellitus tipo 2; RTDM: com remissão total do diabetes mellitus tipo 2. Achados no pré-operatório.52

Figura 12: Predição de remissão total do DM2 após DGYR baseado no perfil do microbioma no pré-operatório.....53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de circunferência abdominal por etnia específica. Adaptado de International Diabetes Federation (IDF)⁵⁵ 26

Tabela 2: Nova Definição de Síndrome Metabólica de acordo com International Diabetes Federation (IDF)⁵⁵ 27

Tabela 3: Dados clínicos e epidemiológicos de mulheres obesas e portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) antes e após 3 e 12 meses da Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR)..... 38

Tabela 4: Ingestão alimentar de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) antes e 3 e 12 meses após Derivação Gástrica em Y Roux (DGYR) 42

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Justificativa	10
1.2 Hipótese	11
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Métodos	14
3.1 Local de execução do trabalho.....	15
3.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	15
3.3 Casuística e critérios de seleção de pacientes	16
3.4 Aspectos éticos	18
3.5 Protocolo do estudo.....	18
3.6 Procedimento cirúrgico	20
3.7 Inquérito alimentar	21
3.8 Medidas antropométricas	23
3.9 Exames bioquímicos	24
3.10 Índice HOMA2	24

3.11 Síndrome metabólica	25
3.12 Remissão do Diabetes tipo 2	27
3.13 Acompanhamento ambulatorial no pós operatório.....	28
3.14 Coleta de fezes	28
3.15 Extração e purificação do DNA das amostras de fezes	29
3.16 Preparo de biblioteca e sequenciamento de DNA fecal	30
3.17 Bioinformática e Bioestatística	31
4. Resultados	36
4.1 Características Descritivas da Amostra	37
4.2 Composição corporal	37
4.3 Perfil metabólico.....	39
4.4 Ingestão alimentar e medicamentosa.....	40
4.5 Alterações do microbioma fecal após DGRY	44
4.6 Microbiota e relação com ingestão de alimentos.....	47
4.7 Remissão Total de Diabetes (RTDM) e Microbiota	51
5. Discussão	54
6. Conclusões	63
7. Anexos	65
Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas FMUSP em 2016	66

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	67
Anexo C – Publicações relacionadas a esse projeto.....	70
Anexo D – Apresentações de resultados em congressos	71
Anexo E – Prêmio Preprosim 2017:	72
8. Referências	73

Resumo

Assal KA. *Análise da microbiota fecal em pacientes obesas graves portadores de diabetes mellitus do tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018

Introdução: A derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) é considerada um bom modelo cirúrgico para estudar mecanismos associados à perda de peso e remissão de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em pacientes obesos. Após DGYR, variações na microbiota intestinal podem ocorrer. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil da microbiota intestinal nos períodos pré e pós-operatório, precoce e tardio, de pacientes obesas diabéticas submetidas à DGYR, e estudar sua associação com variáveis clínicas, antropométricas, de ingestão alimentar e remissão total de DM2. **Métodos:** O perfil da microbiota intestinal foi avaliado em amostras fecais obtidas de mulheres obesas com DM2 no momento pré-operatório - basal (n=25), três meses (n=20) e 12 meses (n=14) após DGYR através do sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S (16SRNA) com equipamento Illumina MiSeq. Nos três períodos foram coletados dados de ingestão alimentar, composição corporal e marcadores bioquímicos. O diagnóstico de remissão total de DM2 foi obtido após 12 meses de cirurgia, respeitando os critérios da *American Diabetes Association* (ADA). **Resultados:** Três meses após DGYR foi observado aumento (n=9) e decréscimo (n=1) de gêneros bacterianos e aumento da riqueza da microbiota intestinal, em relação aos apresentados no momento basal ($p \leq 0,05$). Nenhuma alteração na abundância da microbiota intestinal foi observada entre 3 e 12 meses após a cirurgia ($p > 0,05$). No entanto, em relação ao momento pré-operatório, a razão Firmicutes/Bacteroidetes diminuiu após 12 meses da cirurgia ($p < 0,037$). Houve aumento na riqueza da microbiota que se associou à maior ingestão de fibras e menor ingestão de gorduras ($p \leq 0,05$), em todos os tempos. Ao longo do período pós-operatório, as variáveis metabólicas gerais mostraram melhora, acompanhadas pela redução significativa de peso corpóreo e massa de gordura. Pacientes com remissão total de DM2 (RTDM) (57%) apresentaram no período pré-operatório aumento de três gêneros de bactérias intestinais e diminuição de dois gêneros, comparado aos doentes sem RTDM. **Conclusões:** Após DGYR, houve alterações quanto à composição do perfil da microbiota intestinal de mulheres obesas diabéticas e aumento da riqueza bacteriana. Os hábitos alimentares também influenciaram a modificação da microbiota fecal. A diferença pré-operatória de gêneros bacterianos encontrada em pacientes com remissão total do DM2 sugere a possibilidade de uso de marcadores microbianos na seleção de pacientes que podem se beneficiar desse efeito metabólico da cirurgia bariátrica.

Descritores: Obesidade; Microbioma Gastrointestinal; Bactéria; Diabetes Mellitus Tipo 2; Derivação Gástrica; RNA Ribossômico 16S; Gene.

Abstract

Assal KA. *Analysis of fecal microbiote in obese patient with type 2 diabetes mellitus submitted to Roux Y Gastric Bypass* [Dissertation]. Dão Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018

Background: Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is considered a good surgical model to study mechanisms associated with weight loss and remission of type 2 diabetes mellitus (DM2) in obese patients. After RYGB, variations in intestinal microbiota may occur.

Objective: To evaluate the profile of the intestinal microbiota in the preoperative and postoperative periods, early and late, of obese diabetic patients submitted to the RYGB, and study the association with clinical, anthropometric, food intake and total remission of DM2.

Methods: The intestinal microbiota profile was evaluated in faecal samples obtained from obese women with DM2 before (n = 25), three months (n = 20) and 12 months (n = 14) after RYGB, by extracting ribosomal RNA 16S and sequencing in Illumina MiSeq. Data on food intake, body composition and biochemical markers were collected in the same periods. The diagnosis of total remission of DM2 was obtained after 12 months of surgery, respecting the criteria of the American Diabetes Association (ADA). **Results:** Three months after DGYR, there was an increase (n = 9) and a decrease (n = 1) in bacterial genus and an increase in intestinal microbiota richness compared to basal ($p \leq 0.05$). No change in intestinal microbiota abundance was observed between 3 and 12 months after surgery ($p > 0.05$). However, in relation to baseline, the Firmicutes / Bacteroidetes ratio decreased after 12 months of surgery ($p < 0.037$). There was an increase in the richness of the microbiota that was associated to the higher fiber intake and lower fat intake ($p \leq 0.05$). Over the postoperative period, the general metabolic variables showed improvement, accompanied by a significant reduction in body weight and loss of fat mass. Patients with total remission of DM2 (TRDM) (57%) in the preoperative period, had an increase in tree genus of bacteria and a decrease in two genera of bacteria compared with patients without a total remission of DM2. **Conclusions:** After RYGB, changes occur in the intestinal microbiota profile of diabetic obese women, in terms of composition and increase of bacterial richness. Feeding habits also influenced the fecal microbiota modification. The difference in bacterial genus found in patients with total remission of DM2 suggests the potential possibility of using microbial markers to select patients who may benefit from this metabolic effect of bariatric surgery.

Descriptors: Obesity; Gastrointestinal Microbiome; Bacteria; Diabetes Mellitus, Type 2; Gastric Bypass; RNA, Ribosomal, 16S; Gene.

1. Introdução

Nas últimas décadas, a prevalência da obesidade tem crescido consideravelmente e, considerando as múltiplas comorbidades relacionadas a essa condição, constituem um problema de saúde pública.^{1,2}

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o índice de obesos no mundo triplicou desde 1975.³ Em 2016 mais de 1.9 milhões de pessoas acima de 18 anos tiveram Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 25 kg/m² e 650 milhões foram classificadas como obesas com IMC acima de 30 kg/m² (figura 1). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde realizada pelo IBGE em 2013, 56,9% da população têm sobrepeso e 20,8% têm obesidade; este, mais frequente em mulheres (24,4%) que em homens (16,8%).⁴

Entre os fatores envolvidos na etiologia da obesidade incluem-se estilo de vida, ingestão alimentar inadequada, falta ou baixa prática de atividade física, mecanismos neuronais e hormonais, assim como fatores genéticos e epigenéticos.^{2,5}

Figura 1: Prevalência (%) de obesidade, sexo feminino, 2016. Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (OMS)

A obesidade pode contribuir para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) e síndrome metabólica (SM) entre outras comorbidades. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o Brasil ocupa o quarto lugar no *ranking* de países com o maior número de casos de DM2 no mundo.⁶

Nos últimos 10 anos, pesquisadores aumentaram seu conhecimento sobre o papel da disbiose (desequilíbrio da microbiota intestinal) nas alterações metabólicas sistêmicas.⁷ Obesidade e suas comorbidades podem estar acompanhadas por mudanças na microbiota intestinal, a qual tem sido considerada um novo fator influenciador da regulação do peso corporal.^{8,9}

O trato gastrointestinal humano, especialmente o cólon, é densamente povoado por bactérias, fungos, *Archea* e vírus. Esse micro-ecossistema

chama-se microbiota intestinal, e pode conter trilhões de microrganismos, número 10 vezes maior que a quantidade de células humanas. A microbiota de cada indivíduo é única e influenciada por vários determinantes como o tipo de parto, amamentação, idade, uso de antibióticos e hábitos de dieta.¹⁰⁻¹² A maior parte das bactérias reside no intestino grosso, pois a presença de ácidos gástricos, ácidos biliares e suco pancreático no duodeno e jejuno inibem o crescimento da maioria dos microrganismos.¹³⁻¹⁵

A colonização bacteriana no intestino se inicia logo após o nascimento. Estas tem importância para a homeostase do organismo humano como um todo, pois participam de múltiplas funções, entre as quais processos digestivos, regulação energética, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), síntese de vitaminas, proteção contra microrganismos patógenos e modulação do sistema imunológico.^{11,16}

Atualmente, técnicas avançadas de sequenciamento do DNA bacteriano e ferramentas de bioinformática auxiliam a identificação de comunidades bacterianas em diversas ordens. Os filos constituem o nível mais alto da classificação, que segue subdividido em classe, ordem, família, gênero e espécie. Os filos mais predominantes na microbiota fecal (90%) são Bacteroidetes e Firmicutes, e os demais são Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia.^{7,17}

Com o desenvolvimento do Projeto Microbioma Humano, foi possível caracterizar o microbioma intestinal em indivíduos saudáveis e em condições não saudáveis específicas, como os distúrbios digestivos e sistêmicos, e a

estes englobam a diabetes, obesidade, autismo e síndrome do intestino irritável.^{18–25}

Assim, presumivelmente, bactérias que colonizam o intestino humano poderiam contribuir na gênese da obesidade e de outras doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), como por exemplo a DM2 e a aterosclerose.^{24,25}

A composição da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos é diferente da encontrada em indivíduos obesos sendo esta caracterizada principalmente pela diminuição da diversidade e riqueza de bactérias.^{9,26,27}

Obesidade e complicações metabólicas como SM e DM2 são mais prevalentes em indivíduos que apresentam menor riqueza da microbiota intestinal, de acordo com estudo dinamarquês em 123 indivíduos não obesos e 169 obesos. Os autores verificaram que 23% da população total apresentavam um perfil com baixa riqueza da microbiota intestinal. Esse perfil foi mais frequente em indivíduos obesos e também associado às variáveis maior adiposidade, resistência à insulina, dislipidemia e fenótipo inflamatório quando comparados a indivíduos com maior riqueza da microbiota. Em adição, esse grupo composto por obesos ganhou mais peso ao longo do tempo e esse resultado sugeresugere que a menor riqueza da microbiota intestinal pode estar associada com o risco aumentado de obesidade e suas comorbidades.^{21,28}

Em camundongos obesos independentemente do tipo de dieta consumida, assim como em humanos obesos, existe o aumento do filo Firmicutes e redução do filo Bacteroidetes fecais.^{9,29,30} No entanto, recente metanálise não encontrou menor proporção de Bacteroidetes em indivíduos

com excesso de peso, sugerindo que as diferenças na microbiota intestinal segundo peso ou IMC possam não ser universalmente verdadeiras.⁷ No entanto, em camundongos livres de germes (*germ free*, GF) eutróficos que receberam transplante fecal de mulheres obesas, ocorreu o aumento da gordura corporal e complicações metabólicas associadas à obesidade. Isso sugere que a transferência de microbiota fecal pode modificar o fenótipo.³¹

Alguns mecanismos foram propostos para explicar a participação da microbiota no desenvolvimento da obesidade. Um deles está relacionado com a regulação da energia e capacidade de microrganismos de fermentar polissacarídeos dietéticos não digeridos por humanos.²⁶ A fermentação de fibras dietéticas resulta em ácidos graxos de cadeia curta que, ao serem absorvidos, induzem a lipogênese *denovo* e aumento dos estoques de triglicérides. Isso ocorre através das proteínas de ligação ao elemento de resposta ao carboidrato (ChREBP) e ao esterol (SREBP1), e também por supressão do fator adipocitário induzido por jejum (FIAF), que inibe a enzima lipase lipoproteica (LPL). Com a supressão do FIAF pela microbiota intestinal, ocorre o aumento da LPL, o que pode induzir o acúmulo de adipócitos no hospedeiro.^{26,32}

Outro mecanismo proposto para explicar a associação entre microbiota intestinal e obesidade é a capacidade da microbiota em reduzir a oxidação de ácidos graxos no fígado por supressão da adenosina monofosfato quinase (AMPk). Essa enzima é encontrada no fígado e em fibras musculares e atua como um indicador de energia celular. A inibição da AMPk resulta na diminuição da oxidação de ácidos graxos e, como consequência, aumento do

acúmulo de gordura. A microbiota intestinal também pode desencadear uma inflamação crônica, devido à ligação de bactérias gram negativas, que possuem em sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS), com os receptores Toll-Like (TLR), principalmente o TLR4.²⁶ Assim, a microbiota intestinal parece ser mais eficiente na extração de energia da ingestão dietética e subsequente armazenamento de gordura em animais obesos do que em animais não obesos. De fato, indivíduos obesos têm níveis fecais mais elevados de ácidos graxos de cadeia curta e calorias alimentares residuais reduzidas, comparados aos indivíduos eutróficos.¹⁵

A relação entre microbiota intestinal, obesidade e alterações metabólicas tem sido mais averiguadas. Não obstante, ainda existem lacunas de conhecimento sobre o impacto que esta compreensão poderia trazer na prática do controle da obesidade e DM2.³³

Os hábitos alimentares são um dos principais contribuintes para a diversidade da microbiota intestinal humana. O tipo de dieta consumida, a curto e a longo prazo tem influência nos metabólitos bacterianos e pode contribuir para extração de energia dos alimentos e regulação da homeostase energética.^{7,28}

A dieta rica em lipídeos e pobre em fibras aumenta em abundância o gênero *Alistipes* tolerantes a bile, *Bilophila* e *Bacteroides*; e reduz em abundância os microrganismos degradadores de polissacarídeos vegetais, como *Roseburia* sp., *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*.³⁴ A ingestão de dieta rica em fibras está correlacionada com o aumento de *Prevotella* e *Xylanibacter* e também com elevada riqueza da microbiota.^{17,28,32,35} Em

contraste, indivíduos que ingerem maior conteúdo de gordura animal apresentam quantidade aumentada de Bacteroidetes. É importante ressaltar que a dieta é capaz de alterar a microbiota em 24 horas, mudança que se estabelece definitivamente ao longo de 10 dias.¹⁷

De Fillipo e cols mostraram a importância da dieta na formação da microbiota. Esse estudo comparou um grupo de crianças italianas alimentadas com dieta ocidental com crianças africanas residentes na zona rural, consumidoras de uma dieta praticamente vegetariana. A microbiota intestinal foi significativamente diferente entre os dois grupos. As crianças africanas apresentaram maior riqueza da microbiota, aumento de Bacteroidetes, diminuição de Firmicutes e abundância de *Prevotella* e *Xylanibacter*, que são bactérias conhecidas por ajudarem na hidrólise de fibras. Nas crianças Italianas foi encontrada maior proporção de Firmicutes e Proteobacterias e menor diversidade. Esses resultados sugerem que a dieta tem papel importante na modulação da microbiota intestinal uma vez que, em comparação às crianças africanas, as crianças Italianas possuem menor diversidade da microbiota, que está relacionado ao menor consumo de fibras, maior consumo de açúcar, produtos industrializados, gordura animal, ou seja, uma dieta de maior densidade calórica.³²

Práticas como dieta, atividade física e medicamentos para perda de peso muitas vezes falham em promover perda de peso suficiente em pacientes com obesidade mórbida. A intervenção cirúrgica do tipo Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) é um dos tratamentos mais efetivos para obesidade grave. Seus benefícios incluem a perda de peso significativa e a melhora ou remissão

de DM2 e outras comorbidades associadas à obesidade.^{35,36} A DGYR mostrou ser um tratamento eficaz no controle de DM2 por ser uma técnica mista, com mecanismos restritivos e disabsortivos. A taxa de remissão do DM2 é de cerca de 72,3% após dois anos e de 30,4% após 5 anos.^{35,37,38}

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA), existe remissão completa e parcial do DM2, no mínimo, 12 meses da cirurgia bariátrica. Segundo os critérios da ADA a remissão parcial do DM2 é considerada quando: hemoglobina glicada (HbA1c) <6,5% e glicemia de jejum (GJ) <126 mg/dl com duração de pelo menos um ano e ausência de uso de terapia farmacológica. A remissão total é o retorno às medidas "normais" do metabolismo da glicose (HbA1C <5,7%, glicemia de jejum <100 mg/dl) com duração de pelo menos um ano e ausência de uso de terapia farmacológica.³⁹

Alterações fisiológicas e anatômicas decorrentes do procedimento cirúrgico contribuem para mudanças na microbiota intestinal.^{30,40} Essas mudanças incluem fluxo biliar, pH colônico, modulação vagal, hormônios entéricos e do tecido adiposo, fluxo de nutrientes e quantidade de alimentos que chega ao cólon.⁴¹ Ocorre maior diversidade microbiana após DGYR, que pode incluir diminuição da razão Firmicutes/Bacteroidetes e aumento no filo *Proteobacteria* em humanos.^{40,42,43} A microbiota de indivíduos pós DGYR é específica e distinta daquela presente em indivíduos eutróficos, e podem estar associadas com melhora metabólica pós operatória.^{30,40,42,44,45}

Transplantes experimentais e humanos de microbiota fecal de indivíduos já operados por DGYR para camundongos GF resultaram em redução de gordura corporal em relação àqueles que receberam transplante de

microbiota fecal de indivíduos obesos.^{31,45} Esses achados sugerem que a microbiota pós DGYR poderia levar a perda de peso e redução de gordura corporal. Embora essas descobertas sejam promissoras, mais estudos são necessários para identificar quais bactérias estão alteradas após a cirurgia e qual a influência delas nas alterações da composição corporal e metabólica.

1.1 Justificativa

A incidência crescente de obesidade e suas comorbidades é preocupante. A DGYR é uma das opções eficazes de tratamento da obesidade grave com remissão do DM2 ao promover a perda de peso significativa e homeostase glicêmica na maioria dos candidatos. A busca pelo entendimento dos mecanismos associados aos benefícios metabólicos após DGYR tem incentivado estudos com a finalidade de propor tratamentos menos invasivos para a doença.

Diversos mecanismos estão implicados na melhora metabólica após a DGYR, incluindo as modificações da microbiota intestinal. A DGYR é um modelo interessante de estudo dessa microbiota no paciente obeso grave e diabético, pois o próprio indivíduo é controle de si mesmo.

Sendo assim, justificam-se as pesquisas para identificar as alterações da microbiota em pacientes obesos pós DGYR e esclarecer a relação dessa variação com a melhora da composição corporal e metabólica. Para isso, é essencial caracterizar o perfil da microbiota intestinal presente no obeso diabético (pré DGYR) e avaliar quais mudanças ocorrem após a perda de peso

(pós DGYR). Esses dados podem atender ao interesse clínico pois, conhecer o papel da microbiota intestinal na modulação do metabolismo do hospedeiro pode trazer possibilidades de modular a microbiota como nova opção de tratamento menos invasivo, ou até identificar marcadores preditivos para obesidade e remissão do diabetes após a DGYR.

1.2 Hipótese

O presente projeto considera que existe mudança significativa na microbiota após a cirurgia bariátrica, e essas alterações podem estar relacionadas com a perda de peso e melhora do diabetes mellitus tipo 2.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Identificar mudanças no perfil da microbiota intestinal nos períodos pré e após 3 e 12 meses de Derivação Gástrica a Y- Roux (DGYR) em mulheres com obesidade grave e diabetes mellitus tipo 2.

2.2 Objetivos específicos

- Correlacionar a análise qualitativa e quantitativa da microbiota intestinal em mulheres diabéticas obesas com as alterações da composição corporal antes e depois de cirurgia de DGYR.
- Correlacionar a microbiota intestinal com modificações de marcadores bioquímicos e ingestão alimentar.
- Correlacionar a microbiota intestinal com remissão total do diabetes mellitus tipo 2.

3. Métodos

3.1 Local de execução do trabalho

Estudo multi-institucional realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Laboratório de Investigação Médica - 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 (HC-FMUSP), Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Escola de Ciências Farmacêuticas, laboratório de bioinformática do Hospital AC Camargo, São Paulo, Brasil, *Institute National de La Recherche Agronomique* (INRA), Jouy an Jousas, França, *Institute of Cardiometabolism and Nutrition* (ICAN), Paris, França.

3.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi submetido à aprovação pela comissão de ética para Análises de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) em 23/02/2011 (Anexo A), sendo parte de um projeto temático, sob o número 1011/2009. A metodologia completa dos outros projetos vinculados a esse temático foi publicada em 2016 no trabalho SURMetaGIT⁴⁶ e registrado no sítio *Clinical Trials*, www.clinicaltrials.gov (NCT01251016). Foi realizado desmembramento do projeto SURMetaGIT e registrado na plataforma Brasil sob número 1.482.754.

3.3 Casuística e critérios de seleção de pacientes

O tamanho amostral deste estudo foi estimado baseado em testes paramétricos (ANOVA) e não paramétrico (Wilcoxon signed-rank teste), e foi definido a inclusão mínima de 20 participantes, valor que apresenta poder de 80% para a detecção de efeitos na microbiota pré e pós DGYR, considerando o valor alfa de 5%.

Foram recrutadas 25 mulheres obesas com IMC médio $\geq 46 \text{ kg/m}^2$ com diagnóstico de DM2, candidatas à cirurgia bariátrica pela técnica de Derivação Gástrica em Y de *Roux* (DGYR) sem anel, no Serviço Gastroenterologia Cirúrgica da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A avaliação foi realizada no período pré-operatório em 25 pacientes, e em dois momentos no período pós-operatório: 3 meses pós DGYR em 20 pacientes e 12 meses em 14 pacientes. Devido ao recrutamento em diferentes períodos estudados, nem todas as pacientes permaneceram até o final do estudo.

Em estudo da microbiota fecal, é importante que haja homogeneidade nas amostras. Considerando que existem diferenças entre a microbiota nos distintos sexos, optou-se pela inclusão exclusiva de pacientes femininas. Em adição ao que foi referido acima, este grupo também tem maior indicação de DGYR em nossa instituição.¹²

O recrutamento foi feito entre fevereiro de 2011 e março de 2015 seguindo os critérios de inclusão e exclusão especificados abaixo:

a) Critérios de inclusão:

- Mulheres com idade entre 18-60 anos;
- Assinar do termo de consentimento livre e esclarecido(TCLE);
- Manifestar interesse, condições e disponibilidade de participar de todos os procedimentos inclusos no protocolo do estudo;
- Diagnóstico comprovado de DM tipo 2 (Glicemia de jejum- GJ > 126 mg/dL – e hemoglobina glicada – HbA1c> 7%) e/ou uso de antidiabético oral;
- Fazer uso de medicação oral para diabetes;
- IMC igual ou superior a 35kg/m² e igual ou inferior a 50kg/m²;
- Candidatas à Derivação Gástrica em Y-Roux (sem anel).

b) Critérios de exclusão:

- Recusa em participar do estudo;
- Diagnóstico de Diabetes tipo 1;
- Não-diabéticos;
- Diagnóstico de doenças da tireoide;
- Uso de qualquer tipo de insulina;
- IMC inferior a 35kg/m² ou superior a 50 kg/m²;
- Disfunção hepática grave. Provas de função hepática – Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e gama-glutamilttransferase (Gama-GT) alternadas em valor igual ou superior a três vezes o valor de referência pela Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP;
- Candidatos a outra técnica cirúrgica bariátrica que não DGYR;
- Participar de outro protocolo de estudo intervencionista;
- Uso de antibiótico, probióticos ou simbióticos no último mês que antecedeu a

coleta de fezes.

3.4 Aspectos éticos

O protocolo foi explicado detalhadamente à paciente e seu representante legal, assim como todos os procedimentos envolvidos. Após concordar em fazer parte do estudo, a paciente ou seu representante legal foi orientado a ler, datar e assinar o TCLE (anexo B).

3.5 Protocolo do estudo

O protocolo compreendeu 10 consultas, sendo 6 realizadas no pré-operatório e 4 realizadas no pós-operatório de 3 e 12 meses, conforme ilustrado nas figuras 2 e 3.

- **Consulta 1 (Pré-operatório):** Paciente entrevistada e questionada quanto à existência de comorbidades associadas a obesidade, uso de medicações, intervenções cirúrgicas prévias e tempo de DM2. As doentes candidatas foram convidadas a participar do estudo. Seguiu-se a explicação detalhada do protocolo e assinatura do TCLE.

- **Consulta 2 (Pré-operatório):** As pacientes em jejum de 12 horas foram submetidas à coleta de sangue para confirmação do diagnóstico de DM2 e de ausência de doença da tireoide e disfunção hepática grave.

- **Consulta 3 (Pré-operatório) e Consulta 7 (Pós-operatório 3 e 12 meses):** Os exames de composição corporal e medida de gasto energético foram realizados conforme será descrito no tópico 3.9.

- **Consulta 4 (Pré-operatório) e Consulta 8 (Pós-operatório 3 e 12 meses):** As consultas de avaliação nutricional foram realizadas conforme será descrito no tópico 3.10.

- **Consulta 5 (Pré Operatório) e Consulta 9 (Pós Operatório 3 e 12 meses):** As pacientes com 12 horas de jejum foram submetidas ao exame de teste de alimentação, após consumo da refeição de prova conforme será detalhado no tópico 3.11.

- **Consulta 6 (Pré-operatório) e Consulta 10 (Pós-operatório 3 e 12 meses):** Após completar sete dias de registro alimentar, coletou-se a amostra fecal na casa da paciente conforme descrito no tópico 3.14.

Figura 2: Esquema de programação de consultas e procedimentos no período pré-operatório.

Figura 3: Esquema de programação de consultas e procedimentos no período pós-operatório.

3.6 Procedimento cirúrgico

Todos as pacientes foram submetidas à cirurgia DGYR padronizada, sem anel de silicone, com alça bilio-pancreática medindo entre 50-60 cm e alça de alimentação entre 100 – 120cm. A técnica de DGYR reduz o volume do

estômago através da realização de uma bolsa gástrica proximal com aproximadamente 30ml de capacidade, excluindo o restante do estômago, duodeno e jejuno proximal do fluxo de nutrientes (figura 04). O procedimento foi acompanhado pelo investigador principal do projeto para assegurar que as alças intestinais fossem devidamente medidas durante a cirurgia e que as anastomoses fossem realizadas conforme padronizado para o presente estudo.

Figura 4: Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR. A: Anatomia normal do trato gastrointestinal. B: Anatomia gastrintestinal alterada após DGYR.

3.7 Inquérito alimentar

A ingestão nutricional foi avaliada por sete dias, através de registro alimentar (a paciente anotou suas refeições durante 7 dias consecutivos, incluindo um final de semana). O inquérito foi aplicado uma semana antes da coleta da amostra de fezes em cada período estudado. Não foi prescrita ou

orientada uma dieta específica em nenhum dos períodos, apenas avaliou-se os hábitos alimentares das pacientes.

A quantidade de alimento consumido foi registrada em medida caseira (por exemplo, colheres, copos), guiados por ilustrações de um livro específico (Consumo Alimentar – Visualizado Porções), que foi oferecido às pacientes. Elas anotaram no registro alimentar o número da foto correspondente ao tamanho da porção alimentar ingerida.⁴⁷

A média de ingestão de calorias, carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e vitamina B12 foi estimada utilizando o software Virtual NutriPlus™ e duas tabelas de composição química dos alimentos, a tabela desenvolvida por Sonia Tucunduva e a tabela brasileira de composição dos alimentos, TACO.^{48,49}

O consumo alimentar adequado foi avaliado utilizando-se como parâmetro as recomendações diárias de ingestão de nutrientes a partir das referências (*Dietary Reference Intake* - DRIs) do Conselho de Alimentação e Nutrição do Instituto de Medicina.⁵⁰

Todas as medicações recebidas foram registradas em todos os períodos e suspensas 24 horas antes da coleta da amostra fecal, com exceção da medicação para hipertensão arterial.

Foi calculado o sub-relato da ingestão energética (SRIE), pela razão da ingestão de energia relatada (IE) sob a taxa de metabolismo basal (TMB). A TMB foi estimada de acordo com a idade, sexo e equação proposta por Schofield.⁵¹ Foi utilizado valor de corte de 0,9 para definir o SRIE de acordo com a razão IE/TMB. Pacientes foram divididos entre SRIE (<0,9) e não SRIE (>0,9).⁵¹

3.8 Medidas antropométricas

As medidas antropométricas foram aferidas no pré-operatório e quinzenalmente no pós-operatório por 3 e 12 meses de cirurgia. O peso foi mensurado em quilogramas (kg) com balança eletrônica para obeso, carga máxima 500kg e divisão 100 gramas (Lucastec®, Brasil), estando o doente com roupas leves. A altura foi medida com auxílio de estadiômetro (Sanny®, American Medical do Brasil) e a paciente posicionada 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/altura².

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 última costela, foi utilizado o ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca (próxima a região umbilical). A circunferência do quadril foi medida no seu maior diâmetro.⁵²

3.9 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 colhidos 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 200ml dieta normocalórica, normolipídica e normoprotéica (*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).

3.10 Índice HOMA2

O índice HOMA2 (do inglês *Homesostatic Model Assessment*) foi calculado a partir de dados de insulina e glicose em jejum, utilizando o programa *Homa Calculator*, lançado em 2004 pela Universidade de Oxford e disponível gratuitamente no site <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>. O modelo de avaliação de homeostase calcula a resistência à insulina (HOMA2-

IR), e estima a função das células beta-pancreáticas (%B) e a sensibilidade à insulina (%S) em valores percentuais de uma população normal de referência.^{53,54}

3.11 Síndrome metabólica

A Síndrome Metabólica, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia foram classificadas de acordo com os critérios da Federação Internacional do Diabetes (IFD), o qual inclui circunferência abdominal acima do ideal para cada etnia (tabela 1) e também os seguintes fatores: altos níveis de triglicérides, baixos níveis de colesterol HDL, hipertensão arterial e glicemia de jejum aumentada (tabela 2).^{6,55}

Tabela 1: Valores de circunferência abdominal por etnia específica. Adaptado de International Diabetes Federation (IDF)⁵⁵

País/Grupo étnico		Circunferência da cintura
Europeus; EUA (ATP III: 102 cm para homens e 88 cm para mulheres) estarão disponíveis para fins clínicos	Masculino	≥ 94 cm
	Feminino	≥ 80 cm
Asiáticos (chineses, malaios e indianos e japoneses)	Masculino	> 90 cm
	Feminino	> 80 cm
Américas (Sul, Central e do Norte)	Usar os mesmos valores dos Asiáticos até dados mais específicos estiverem disponíveis	
Africanos	Usar os mesmos valores dos Europeus até dados mais específicos estiverem disponíveis	
Oriente médio e população do Mediterrâneo	Usar os mesmos valores dos Europeus até dados mais específicos estiverem disponíveis	

Tabela 2: Nova Definição de Síndrome Metabólica de acordo com International Diabetes Federation (IDF)⁵⁵

Critérios para Síndrome Metabólica incluem: Obesidade abdominal (definida pela circunferência abdominal, valores de acordo com a etnia) ± dois dos seguintes fatores:	
Aumento de Triglicérides	>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 $\geq$ 130 mm/Hg ou Diastólica BP $\geq$ 85 mm/Hg ou tratamento para Hipertensão Arterial
Glicemia de jejum aumentada	$\geq$ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) ou diagnóstico prévio de diabetes mellitus tipo 2

Fonte: Adaptado de International Diabetes Federation (IDF)⁵⁵

3.12 Remissão do Diabetes tipo 2

Após completarem 12 meses de cirurgia, as pacientes foram agrupadas em duas categorias: remissão total ou remissão parcial do diabetes, de acordo com os critérios da ADA (Associação Americana do Diabetes).⁵⁶

- Remissão total do diabetes: Glicemia de jejum <100 mg/dL, HBA1c < 6% sem uso de medicamentos anti-diabéticos oral ou outros procedimentos para diabetes no último ano.
- Remissão parcial do diabetes: Glicemia de jejum 100-125 mg/dL, HBA1c <6%. sem uso de medicamentos anti-diabéticos oral ou outros procedimentos para diabetes no último ano.

3.13 Acompanhamento ambulatorial no pós operatório

Durante as consultas de acompanhamento ambulatorial no período pós operatório, medidas de peso corpóreo, pressão arterial e informações sobre tratamento medicamentoso foram coletadas. As consultas de retorno sempre foram realizadas no período de manhã, com a paciente em jejum de 12 horas para coletas de sangue e análises bioquímicas.

3.14 Coleta de fezes

As amostras de fezes foram coletadas pelo próprio paciente, em sua residência, utilizando coletor próprio (*Fischer Scientific*, Hampton, NH, USA) no dia anterior a cirurgia, após 3 meses e 12 meses após a DGYR.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Laboratório de Investigação Médica - LIM 35) em temperatura controlada por gelo seco à -20°C por período máximo de 4 horas.

A seguir, o conteúdo foi separado em alíquotas de 200mg e estocados em freezer com temperatura de -80°C, até a extração do DNA e análise.

3.15 Extração e purificação do DNA das amostras de fezes

Com autorização da Anvisa, as amostras de fezes foram exportadas para a sede da Metagenópolis, Instituto INRA, *Jouy an Josas*, França, pela empresa *World Currier*, em temperatura controlada à – 80°C. Nessa instituição, foi realizada a extração de DNA fecal pelo pesquisador responsável (KAA), supervisionada por especialistas locais.

O DNA foi extraído das alíquotas de fezes pelo método *bead better* (IHMS-SOP06 <http://www.microbiome-standards.org>). Em suma, o método é composto por quatro etapas distintas: lise celular por tratamento químico e mecânico, eliminação de restos celulares por precipitação e centrifugação, digestão enzimática do RNA e precipitação alcóolica do DNA. Após a precipitação final, o DNA foi ressuspenso em solução tamponada e armazenado em -20°C, para futuras análises.

O DNA fecal extraído foi reenviado para o Brasil pela empresa *World Currier*, para a realização do sequenciamento na Universidade de São Paulo, Escola de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia.

3.16 Preparo de biblioteca e sequenciamento de DNA fecal

A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida pela amplificação da região V4 do gene 16S rRNA na plataforma Illumina® MiSeq44.

Usando as seguintes sequências de primer:

V4F (*forward*):

TCGTCGGCAGCCAGTGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

V4R (*reverse*):

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

A construção da biblioteca de sequenciamento do DNA foi realizada em dois passos, segundo instruções do fabricante (*Illumina*, San Diego, CA, USA).

A primeira amplificação foi feita em duplicada e os amplicons foram submetidos à primeira purificação. As amostras foram inseridas na plataforma Illumina MiSeq estilo *clamshell* utilizando o kit v2, 500 ciclos. A biblioteca foi agrupada a uma densidade de cerca de 800 K/mm². Análise de imagem e avaliação da qualidade dos dados foram realizados no equipamento MiSeq. Para confirmar que os reagentes de PCR não foram fontes contaminantes de sequências bacterianas, foi realizada uma PCR controle negativo. Além disso, antes da extração e amplificação, todos os reagentes foram expostos à luz ultravioleta de 254nm por 3 minutos.

3.17 Bioinformática e Bioestatística

O banco de dados fornecido pela empresa Illumina foi analisado no Laboratório de Bioinformática do Hospital AC Camargo. A análise foi realizada utilizando o *software* *mothur* v.1.36.1.⁵⁷ As sequências V4 *paired-end* provenientes do sequenciador Illumina MiSeq foram montadas e filtradas seguindo o protocolo padrão do *mothur* (www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) como descrito anteriormente.⁵⁸

Para cada sequência, *contigs* foram criados sobrepondo o *read* 1 e o *read* 2 e os iniciadores de amplificação do gene 16s rRNA foram trimados permitindo no máximo 2 descasamentos. Os *contigs* montados foram filtrados excluindo-se aqueles que tinham tamanho inferior a 250 pares de bases (pb) e superior a 275pb, excluindo qualquer base ambígua e as que não se alinharam contra a região V4. Sequências únicas foram identificadas e quantificadas para cada amostra, e depois foi feita a limpeza dos ruídos utilizando um algoritmo de pré-agrupamento.⁵⁹

As sequências foram filtradas por possíveis quimeras usando o *software* UCHIME e classificadas utilizando um classificador Bayesiano e um conjunto de treinamento do gene 16s rRNA do Ribosomal Database Project (versão 9) que incluiu sequências de rRNA de mitocôndrias e eucariotos.^{60,61}

Sequências classificadas em domínios não bacterianos, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, *Archaeas* e Eucariotas, foram excluídas. As sequências remanescentes foram divididas com nível de ordem taxonômica para que unidades taxonômicas operacionais (UTOs – OTUs) fossem criadas com 3% de dissimilaridade.

Os dados de bioinformática foram submetidos à análise bioestatística no *Institute of Cardiometabolism and Nutrition* (ICAN), Paris, França em presença do pesquisador KAA. Para evitar o viés de variáveis de profundidade do sequenciamento, os dados foram igualados em 61 mil leituras e normalizados pela abundância total, resultando em abundâncias relativas. Estas foram posteriormente analisadas utilizando o pacote MOMR.

A distribuição de leituras foi padronizada através do processo de diminuição e aumento até 100.000 leituras, número considerado suficiente após a filtragem (figura 5A). Para análise de riqueza de bactérias em Gênero e em OTU (figura 5B) foi usado teste pareado de Mann-Whitney. A seguir, foi aplicado o teste de rarefação, para verificar se a amostragem disponível foi suficiente para alcançar o número de gêneros de bactérias necessários para análise (figura 5C).

A estabilização da curva de rarefação indica que o número total de gêneros da amostra foi atingido. Para as amostras que não atingiram número suficiente de gêneros foi realizado um novo cálculo para estimar o platô da curva. Foi testado a distribuição da razão de Firmicutes para Bacteroidetes ($\log_{10}$), considerando todos os pacientes em todos os tempos (figura 5D).

Figura 5: Análise específica do perfil da microbiota intestinal de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) antes e após 3 e 12 meses de DGYR. **A:** Número de leituras sequenciadas e filtradas para cada amostra. **B:** Riqueza calculada nos níveis da unidade taxonômica operacional (OTU) versus riqueza calculada no nível do gênero; **C:** Análise de rarefação dos dados do microbioma no nível do gênero; **D:** distribuição da razão de Firmicutes para Bacteroidetes (log10), considerando mais pacientes do que os mostrados na Figura 7C ($n = 25$ para pré-operatório, $n = 20$ para pós-operatório de 3 meses e $n = 14$ para pós-operatório de 12- meses).

Calculou-se a correlação de Spearman (figura 6) e para aqueles casos que o coeficiente foi 1, foi construída uma análise de componente Principal (PCA) para pacientes com amostras nos três períodos (n=14). Testes estatísticos não paramétricos: Mann-Whitney, Correlação de Spearman e Kruskal Wallis foram aplicados quando se utilizaram dados de metagenômica. Análises de curso temporal foram realizadas utilizando testes pareados para cada período pós-operatório em comparação com o basal. Os valores do nível de significância (p) foram ajustados por teste de comparações múltiplas usando o método de Benjamini-Horchberg considerado significativo quando FDR (*False Discovery Rate*) <5%, a menos que especificado de outra forma. Correlações foram investigadas usando a correlação de Spearman e coeficiente de correlação (ρ), com o valor de significância de acordo com o valor de p . Análises e gráficos foram executadas usando a plataforma estatística R.

Análises preditivas foram realizadas usando o pacote *Kernlab* do R, com a classificação de modelo *Support Vector Machine* (SVM) (linear de kernel) com parâmetros padrão e otimizado $c=10$ na validação cruzada. O modelo foi aprendido usando todas as amostras no pré-operatório (n=14 pacientes, 8 com RTDM e 6 sem RTDM).

Devido ao número baixo de amostras, o algoritmo foi testado em validação cruzada com $k=2$ e desenhado 50 vezes com diferentes origens (total de 100 *K-folds*) . Diferentes modelos foram criados com o subconjunto das variáveis mais correlacionadas. O modelo final foi selecionado com o número de recursos que maximizaram os resultados dos testes da validação cruzada. Os gráficos foram criados usando o software R e o pacote *ggplot2*.

Figura 6: Análise de Spearman de similaridade a nível de Gênero. Horizontal: marrom – pré-operatório, vermelho – pós-operatório 3 meses, amarelo – pós-operatório 12 meses. Vertical: cada cor representa um paciente.

4. Resultados

4.1 Características Descritivas da Amostra

O presente estudo testou a hipótese da microbiota intestinal de mulheres obesas portadoras de DM2 estar alterada após a DGYR e que essa alteração pode estar relacionada com a perda de peso e melhora da DM2.

Das 25 pacientes selecionadas, apenas 20 completaram o protocolo até três meses após DGYR e 14 pacientes completaram os 12 meses após DGYR.

4.2 Composição corporal

No período pré-operatório, o IMC médio foi $46,0 \pm 5,25 \text{ kg/m}^2$, indicando pacientes com obesidade grave. Após três meses da DGYR as variáveis de composição corporal diminuíram significativamente, incluindo peso, porcentagem de gordura, circunferência abdominal e de quadril. O IMC médio reduziu para $37,9 \pm 3,97 \text{ kg/m}^2$, caindo da classificação de obesidade grave para obesidade II (tabela 3, figura 6A). Ao se comparar o período de três meses com o de 12 meses após DGYR, verificou-se que todas as variáveis de composição corporal continuaram diminuindo, alcançando significativa diminuição no IMC com média $32,7 \pm 3,54 \text{ kg/m}^2$, perda de gordura (10,3%), e aumento do percentual de massa magra (5%). Tabela 3 e figura 6A.

Tabela 3: Dados clínicos e epidemiológicos de mulheres obesas e portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) antes e após 3 e 12 meses da Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR).

	Pré-operatório (Pré)		Pós 3 meses (3M)		Pré x 3M		Pós 12 meses (12M)		Pré x 12M		3M x 12M	
	N=14*		N=14*		N=14*		N=14*		N=14*		N=14*	
	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média ± DP	Valor de P ^Δ
Idade (anos)	46 ± 6	NA	46 ± 6	NA	46 ± 6	NA	46 ± 6	NA	46 ± 6	NA	46 ± 6	NA
Peso (Kg)	114,0 ± 16,0	<0,001	94,1 ± 12,7	<0,001	81,2 ± 11,1	<0,001	81,2 ± 11,1	<0,001	81,2 ± 11,1	<0,001	81,2 ± 11,1	<0,001
IMC (kg/m ²)	46,0 ± 5,25	<0,001	37,9 ± 3,97	<0,001	32,7 ± 3,54	<0,001	32,7 ± 3,54	<0,001	32,7 ± 3,54	<0,001	32,7 ± 3,54	<0,001
Cintura (cm)	125 ± 14,7	<0,05	111 ± 13,3	<0,05	103 ± 11,5	<0,05	103 ± 11,5	<0,05	103 ± 11,5	<0,05	103 ± 11,5	<0,05
Quadril (cm)	139 ± 9,57	<0,05	123 ± 10,2	<0,05	113 ± 7,97	<0,05	113 ± 7,97	<0,05	113 ± 7,97	<0,05	113 ± 7,97	<0,05
Gordura (%)	51,8 ± 7,65	<0,05	47 ± 6,56	<0,05	41,5 ± 6,72	<0,05	41,5 ± 6,72	<0,05	41,5 ± 6,72	<0,05	41,5 ± 6,72	<0,05
Cintura/Quadril (cm)	0,90 ± 0,08	0,53	0,90 ± 0,01	0,53	0,91 ± 0,05	0,666	0,91 ± 0,05	0,666	0,91 ± 0,05	0,666	0,91 ± 0,05	0,666
Pressão sistólica (ppm)	159 ± 26,6	<0,05	143 ± 16,9	<0,05	138 ± 20,7	<0,05	138 ± 20,7	<0,05	138 ± 20,7	<0,05	138 ± 20,7	<0,05
Pressão diastólica (ppm)	101 ± 24,1	<0,05	89,2 ± 13,0	<0,05	90,9 ± 14,9	<0,05	90,9 ± 14,9	<0,05	90,9 ± 14,9	<0,05	90,9 ± 14,9	<0,05
Glicemia jejum (mmol/l)	228 ± 78,5	<0,001	102 ± 26,5	<0,001	92,9 ± 15,9	<0,001	92,9 ± 15,9	<0,001	92,9 ± 15,9	<0,001	92,9 ± 15,9	<0,001
Insulina jejum (mmol/l)	15,7 ± 5,91	<0,05	7,85 ± 3,66	<0,05	6,16 ± 1,95	<0,05	6,16 ± 1,95	<0,05	6,16 ± 1,95	<0,05	6,16 ± 1,95	<0,05
Peptídeo C (mmol/l)	3,95 ± 1,22	<0,05	2,58 ± 0,67	<0,05	2,32 ± 0,51	<0,05	2,32 ± 0,51	<0,05	2,32 ± 0,51	<0,05	2,32 ± 0,51	<0,05
HbA1c	9,05 ± 1,78	<0,001	6,13 ± 0,57	<0,001	5,74 ± 0,54	<0,001	5,74 ± 0,54	<0,001	5,74 ± 0,54	<0,001	5,74 ± 0,54	<0,001
HOMA-IR	8,26 ± 3,46	<0,05	1,79 ± 0,85	<0,05	1,4 ± 0,47	<0,05	1,4 ± 0,47	<0,05	1,4 ± 0,47	<0,05	1,4 ± 0,47	<0,05
HDL (mg/dL)	44,9 ± 11,4	0,431	43,9 ± 10,2	0,431	53,4 ± 12,9	<0,05	53,4 ± 12,9	<0,05	53,4 ± 12,9	<0,05	53,4 ± 12,9	<0,05
LDL (mg/dL)	113 ± 31,2	0,069	90,1 ± 26,7	0,069	85 ± 18,7	<0,05	85 ± 18,7	<0,05	85 ± 18,7	<0,05	85 ± 18,7	<0,05
VLDL (mg/dL)	25,9 ± 8,05	<0,05	20,1 ± 6,53	<0,05	16,9 ± 2,96	<0,05	16,9 ± 2,96	<0,05	16,9 ± 2,96	<0,05	16,9 ± 2,96	<0,05
Colesterol total (mg/dL)	184 ± 34,4	<0,05	154 ± 31,9	<0,05	155 ± 20	<0,05	155 ± 20	<0,05	155 ± 20	<0,05	155 ± 20	<0,05
Triglicérides (mg/dL)	129 ± 40,6	0,055	101 ± 32,5	0,055	83,9 ± 14,6	<0,05	83,9 ± 14,6	<0,05	83,9 ± 14,6	<0,05	83,9 ± 14,6	<0,05
Hipercolesterolemia(%)	50	0,343	76	0,343	7	0,077	7	0,077	7	0,077	7	0,077
Hipertiglicidemia (%)	71	0,683	86	0,683	7	0,371	7	0,371	7	0,371	7	0,371
Síndrome metabólica (%)	100	<0,05	64	<0,05	36	0,074	36	0,074	36	0,074	36	0,074
Metformina (%)	93	1	14	1	14	1	14	1	14	1	14	1
RTDM(%)	NA	NA	NA	NA	57	NA	57	NA	57	NA	57	NA

Abreviações: IMC, Índice de massa corporal; HbA1c, Hemoglobina Glicada; HDL, Lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR, Índice de resistência a insulina; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; MetS, Síndrome Metabólica; SD, desvio padrão; VLDL, lipoproteína de muito baixa intensidade. *exceto para Peptídeo C, Glicemia, HOMA-IR e VLDL (n = 13); **exceto para insulina, Peptídeo C e glicemia (n = 11), e para HbA1c (n = 13); ***exceto para Peptídeo C (n = 13); #versus pré-operatório; #versus pós-operatório 3 meses.

4.3 Perfil metabólico

Em relação às variáveis bioquímicas, os exames relacionados com o metabolismo da glicose diminuíram significativamente após três meses da DGYR: peptídeo C, glicose, insulina, HOMA-IR e HbA1c (tabela 3 e figura 6B). Ao compararmos os resultados bioquímicos do período pré DGYR com o de 12 meses pós-operatório também houve redução significativa desses resultados. Importante ressaltar que houve uma redução significativa dos valores do HOMA-IR entre os períodos pré-operatório e pós-operatório três meses ($p<0,05$), com diferença ainda mais significativa ($p<0,001$) quando comparamos os períodos pré-operatório e pós-operatório de 12 meses, sendo esse um dos índices que estão incluídos nos critérios para a remissão total do DM2.

No período pré DGYR, todas as pacientes apresentavam critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (SM). Porém, após três meses a incidência de SM diminuiu para 64% e apenas 36% das pacientes mantiveram critérios para SM após 12 meses do procedimento cirúrgico como mostra a tabela 3 e a figura 7B.

No período pré DGYR, 50% das pacientes apresentavam hipercolesterolemia e 71% apresentavam hipertrigliceridemia, que reduziram após três meses de cirurgia para 20% e 15%, respectivamente.

Esses percentuais reduziram após 12 meses, para 7% em ambas as comorbidades (tabela 3). Assim, houve redução significativa nos exames bioquímicos de colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides após 3 meses de DGYR, e continuaram diminuindo após 12 meses, com exceção do HDL, que mostrou aumento significativo após 12 meses de DGYR (tabela 3).

4.4 Ingestão alimentar e medicamentosa

No período pré-operatório, 93% das pacientes fizeram uso de metformina para controle de DM2. Esse valor reduziu-se para 14% após três meses de DGYR e se manteve igual após 12 meses. O uso de medicamentos para hipertensão, colesterol e depressão diminuiu significativamente. A remissão total do diabetes (RTDM2) ocorreu em 57% das doentes (n=8), enquanto que 42,8% (n=6) não obtiveram a remissão total. Destas, 50% (n=3) tiveram remissão parcial do diabetes. Dados mostrados na tabela 3 e na figura 7C.

No período pré DGYR, todas as pacientes apresentavam critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (SM). Porém, após três meses a incidência de SM diminuiu para 64% e apenas 36% das pacientes mantiveram critérios para SM após 12 meses do procedimento cirúrgico, como informa a tabela 3 e a figura 7C.

O consumo de calorias e de todos os macronutrientes diminuiu significativamente após três meses da DGYR incluindo a ingestão de calorias (1700,46 vs 956,78 cal, $p<0,05$), de carboidratos (212,31 vs 106,68g, $p<0,05$), de lipídeos (64,46 vs 38,57, $p<0,05$) e de proteínas (71,78 vs 48,31g, $p<0,05$). Houve queda significativa na ingestão de gordura poli-insaturada no período de 3 meses na comparação com 12 meses de pós-operatório (8,36g vs 6,22g, $p<0,05$) (tabela 4 e figura 7C). É notável que a ingestão de calorias e carboidratos aumentou após 12 meses de DGYR, quando comparados com os dados em 3 meses pós-operatórios ($p<0,05$, figura 7C).

Para avaliar não apenas a quantidade de alimento consumido, mas a qualidade da alimentação, foi calculada a razão de ingestão de fibra/lipídeos (rF/L). Não houve mudança da razão de ingestão rF/L entre os diferentes tempos (pré-operatório, 3 e 12 meses pós-operatório), o que sugere que, apesar das pacientes ingerirem menores volumes de alimento, elas continuaram com o mesmo padrão de alimentação pobre em fibras e rico em lipídeos (tabela 4 e figura 7C).

Como esperado, durante todos os períodos, nas pacientes com super obesidade, 62,8% delas foram classificadas com sub-relato da ingestão energética (SRIE).

Tabela 4: Ingestão alimentar de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) antes e 3 e 12 meses após Derivação Gástrica em Y Roux (DGYR)

	Pré-operatório (Pré)	Pós-Operatório 3 meses (3M)	Pré x 3M	Pós 12 meses (12M)	Pré x 12M	3M x 12M
	Média ± DP	Média ± DP	Valor de P ^Δ	Média + DP	Valor de P ^Δ	FDR ^Δ
	(n= 14*)	(n= 14**)	(n= 14**)		(n=14***)	
Calorias ingeridas	1570 ± 281	1000 ± 254	<0,001	1280 ± 356	<0,05	<0,05
Carboidratos (g)	201 ± 32	116 ± 32	<0,001	157 ± 47,8	0,001	<0,05
Proteína (g)	67,2 ± 15	48,8 ± 15,7	<0,05	61,2 ± 17,4	0,426	<0,05
Fibras (g)	15,3 ± 6,0	9,41 ± 3,5	0,001	10,7 ± 3,05	<0,05	0,173
Fibra solúvel (g)	2,38 ± 1,55	1,28 ± 0,67	<0,05	1,69 ± 0,79	0,068	0,101
Fibra insolúvel (g)	3,45 ± 1,19	2,42 ± 1,06	<0,05	2,83 ± 1,09	0,094	0,125
Lipídeos (g)	58,6 ± 14,8	39,5 ± 12,1	<0,001	39,8 ± 8,46	<0,001	0,855
Gordura moninsaturada (g)	15,5 ± 4,07	10,6 ± 4,23	<0,05	11,6 ± 1,63	<0,05	0,296
Gordura poliinsaturada (g)	11,8 ± 3,14	8,36 ± 2,30	<0,05	6,22 ± 1,1	0,002	<0,05
Gordura saturada (g)	16,4 ± 4,52	10,7 ± 3,70	<0,05	10,1 ± 2,98	<0,001	0,952
Vitamina B12 (g)	0,88 ± 0,21	0,79 ± 0,33	0,432	0,819 ± 0,46	0,110	0,132
Razão Fibra/lipídeo	0,286 ± 0,132	0,245 ± 0,068	0,502	0,275 ± 0,084	0,808	0,326

Figura 7: Marcadores metabólicos, antropométricos e de ingestão alimentar de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses de DGYR. Dados de marcadores metabólicos no pré-operatório (n=25 verde), pós-operatório 3 meses (n=20, roxo) e pós-operatório 12-meses (n=14, azul) são mostrados: **A:** Marcadores de composição corporal (peso [kg], índice de massa corporal [kg/m²], quadril [cm], gordura [%]); **B:** Prevalência de síndrome metabólica e mudanças em marcadores de resistência a insulina (Insulina de jejum [mU/mL], índice HOMA, e peptídeo C [ng/mL]); **C:** Metformina (%) e marcadores de ingestão alimentar (Ingestão de energia [cal], carboidrato [g], razão fibra/lipídeo [g]).

4.5 Alterações do microbioma fecal após DGRY

A primeira análise objetivou testar a alteração da riqueza da microbiota, analisada através da contagem dos gêneros de bactérias após a DGRY. Foi observado aumento significativo após três meses ($n=20$; $p<0,006$, teste pareado de Mann-Whitney) que se manteve aos 12 meses da DGRY (figura 8A). Também foi verificada a riqueza da microbiota pela medida da OTU (Unidade Taxonômica Operacional), que indica diversidade bacteriana. Ao comparar a OTU com a riqueza obtida por contagem de gênero de bactérias, observou-se semelhança entre ambas, comprovando o aumento da riqueza da microbiota pós-operatória em quantidade de bactérias e em diversidade de gêneros (figura 5D).

Para mostrar a relação da microbiota intestinal em cada período estudado (pré-operatório, pós 3 e 12 meses) fizemos a análise do coeficiente de correlação de Spearman (S) (figura 6). Na figura 6 é possível observar que as amostras se agrupam por tempos estudados, o que confirma a mudança na microbiota entre os períodos. Com os dados da análise S construímos a análise de componente principal para as pacientes com amostras disponíveis nos três períodos ($n=14$). A figura 8B ilustra as mudanças globais na microbiota do intestino entre os períodos estudados. Os dois primeiros componentes principais (pré-operatório e 3 meses pós-operatório) se correlacionam com a riqueza de gênero ($\rho>0,41$). Essa análise mostrou mudança no microbioma intestinal entre os tempos, mas a maior delas foi verificada após 12 meses de cirurgia. Houve redução significativa, na razão de Firmicutes/Bacteroidetes quando se comparou a razão no período pré DGRY com 12 meses após

cirurgia, como mostra a figura 8C ($rFB = 1.53$, $p < 0.046$). No entanto, isso não ocorreu na comparação com 3 meses após DGYR.

Finalmente, foram avaliadas as mudanças específicas da microbiota após DGYR ao nível de gênero de bactérias. A microbiota mudou significativamente, principalmente quando comparados os períodos pré DGYR e após três meses ($n=20$ pacientes). Foi observado aumento em nove gêneros de bactérias: *Veillonella*, *Streptococcus*, *Atopobium*, *Gemella*, *Lactobacillales* não classificado, *Oribacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia* e uma *Pasteurellaceae* não classificada. Os filos de bactérias aumentaram após três meses de DGYR, nas seguintes proporções: 66,6% de Firmicutes, 22,2% de Proteobacteria, 11,1% de Actinobactérias e 11,1% de Fusobacteria. Houve diminuição em somente um gênero de bactéria, *Fecalibacterium*, do filo Firmicutes (FDR $<0,005$, figura 8D).

Figura 8: Perfil da microbiota de mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses da DGYR. Dados do perfil da microbiota no pré-operatório (verde), pós-operatório 3 meses (roxo) e pós-operatório 1 ano (azul) são mostrados: **A:** Riqueza de gênero (n=25 para basal, n=20 para pós-operatório 3-meses e n=14 para pós-operatório 12-meses); **B:** Mudanças na microbiota (Análise de PcoA, n=14 para todos os tempos estudados); **C:** Razão firmicutes/bacteroidetes (n=14 para todos os tempos estudados); **D:** Mudanças em gênero para pós-operatório 3 meses vs. pré-operatório (n=20) e para pós-operatório 12 meses. Pré-operatório (n=14).

4.6 Microbiota e relação com ingestão de alimentos

Após ser verificado que a riqueza da microbiota aumentou após DGYR, foi avaliado o impacto da ingestão alimentar nessa riqueza por período, individualmente em cada paciente. No pré-operatório, a riqueza bacteriana mostrou correlação direta com a rF/L ($\rho=0,6$, $p<0,005$, $\text{fdr}<0,013$; figura 9A), ou seja, quanto maior a quantidade de fibras ingeridas e menor a quantidade de lipídeos, maior foi a riqueza da microbiota. Similar correlação direta aconteceu com a ingestão de fibras isoladas ($\rho=0,51$, $p<0,021$, $\text{fdr}<0,048$; figura 9B). Portanto as pacientes que consumiram mais fibras e menos gordura na dieta, apresentaram maior riqueza da microbiota.

Três meses após a DGYR, a riqueza bacteriana também apresentou correlação direta com a rF/L ($\rho=0,55$, $p<0,012$, $\text{fdr}<0,03$; figura 9C). As pacientes que no pós-operatório consumiram mais fibras e menor quantidade de lipídeos conseguiram potencializar a riqueza de sua microbiota em relação àquelas que fizeram a cirurgia e consumiram pouca fibra e alto teor de gordura. Reforçando esse achado, foi encontrada correlação inversa da riqueza da microbiota com a ingestão de lipídeos isolados ($\rho=0,46$, $p<0,043$, $\text{fdr}<0,051$; figura 9E). Ao ser avaliada a ingestão alimentar de vitamina B12 após três meses de DGYR, foi observada correlação inversa com a riqueza da microbiota entre as pacientes, ou seja, quanto maior a ingestão dietética de vitamina B12, menor foi a riqueza da microbiota ($\rho=0,47$, $p<0,036$, $\text{fdr}<0,051$; figura 9D).

A correlação inversa entre a ingestão de lipídeos e a riqueza da microbiota se manteve 12 meses após DGYR ($\rho<0,57$, $p<0,033$; figura 9F).

Pré operatório

Pós 3 meses

Pós 12 meses

Figura 9: Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota em mulheres obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 antes e após 3 e 12 meses da DGYR. **A:** Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota no pré-operatório, razão fibra/lipídeo. **B:** Ingestão de fibras e riqueza da microbiota no pré-operatório. **C:** Associação entre ingestão alimentar e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses, razão fibras/lipídeos. **D:** Ingestão de vitamina B12 e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses. **E:** Ingestão de lipídeos e riqueza da microbiota no pós-operatório de 3 meses. **F:** Associação entre Ingestão de lipídeos e a riqueza da microbiota no pós-operatório de 12 meses.

Foi avaliada a influência que os diferentes macronutrientes poderiam exercer sobre os tipos de gêneros bacterianos. Para isso, agrupou-se todos os períodos estudados e correlacionou-se os distintos nutrientes com os gêneros bacterianos, independente do tempo do evento. A ingestão de lipídeos (g) se correlacionou de forma direta com o gênero *Acidaminococcaceae* não classificado ($\rho=0,68$, $p<0,001$) e de forma inversa com *Parabacteroides* ($\rho=-0,57$, $p<0,008$; figura 10). A ingestão de proteínas mostrou correlação inversa com a presença de *Akkermansia* ($\rho = -0,63$, $p<0,002$), e direta com níveis de *Veillonellaceae* não classificada ($\rho = 0,57$, $p<0,008$; figura 10). A ingestão de carboidratos apontou correlação inversa com *Butyricimonas* ($\rho = -0,64$, $p< 0,003$) e *Proteobacteria* não classificada ($\rho = -0,57$, $p<0,009$), e correlação direta com *Rothia* ($\rho = 0.64$, $p< 0.003$; figura 10). Finalmente, a rFL mostrou forte correlação com *Collinsella* ($\rho = 0.72$, $p<0.0004$; figura 10).

Ingestão de fibra e relação com gêneros de bactérias, pré DGYR

Ingestão de lipídeos e relação com gêneros de bactérias, pré DGYR

Ingestão de proteína e relação com gênero de bactérias, pré DGYR

Ingestão de carboidratos e relação com gêneros de bactérias, pré DGYR

Figura 10: Perfil de microbiota intestinal de mulheres obesas e portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e relação com ingestão alimentar. Todos os tempos. Branco: ausência da bactéria. Vermelho: presença da bactéria.

4.7 Remissão Total de Diabetes (RTDM) e Microbiota

A remissão da diabetes, total e parcial, foi observada na maioria das pacientes. Foi avaliada em 14 pacientes, em todos os períodos do estudo, a relação entre a mudança na microbiota e a RTDM. Não foi encontrada diferença significativa na riqueza dos gêneros bacterianos entre as pacientes com (n=8) e sem (n=6) remissão total do diabetes após a DGYR.

Foi notável que as pacientes que alcançaram RTDM apresentaram ainda no período pré DGYR um perfil de microbiota intestinal diferente das pacientes sem RTDM. Houve aumento significativo de três gêneros de bactérias: *Gemella*, *Coprococcus* e *Desulfovibrio*, e diminuição significativa de dois gêneros: *Assaccharobacter* e *Atopobium* ($p < 0,05$; figura 11). Essa diferença na microbiota perdeu significância estatística após DGYR.

Essas associações univariadas indicaram um potencial da microbiota intestinal em prever o resultado da remissão do DM2 após a cirurgia. Com isso, essa hipótese foi testada através da construção de um modelo multivariado usando (SVM). Com apenas 10 gêneros, foi possível classificar corretamente todos os pacientes quanto ao status de RTDM (figura 12A). Esses 10 gêneros apresentaram diferenças em abundância e prevalência entre os dois grupos (figura 12B). Foi testada a generalização da abordagem com validação cruzada e foi mostrado que a predição generalizou bem, com média de 0,94 do teste, erro padrão médio $< 0,01$ e intervalo de confiança variando de 0,92 a 0,96.

Figura 11: Alteração na microbiota de pacientes com remissão total de diabetes (RTDM) e sem remissão total de diabetes (Sem RTDM) no pré-operatório. Sem RTDM: sem remissão total do diabetes mellitus tipo 2; RTDM: com remissão total do diabetes mellitus tipo 2. Achados no pré-operatório.

Figura 12: Predição de remissão total do DM2 após DGYR baseado no perfil do microbioma no pré-operatório.

A: Gráfico de ROC de um modelo de classificação com 10 características mais correlacionadas com o status do RTDM construído com um kernel linear.

B: Esquerda: Distribuição de abundancia das 10 bactérias. **Direita:** Prevalência de gêneros em cada grupo (círculos verde e azul) e para todo o conjunto de dados (barra cinza) indicada como porcentagem da coorte total (n=14). Sem RTDM: sem remissão total do diabetes mellitus tipo 2; RTDM: com remissão total do diabetes mellitus tipo 2. Achados no pré-operatório.

1: k Bacteria; p Firmicutes; c Bacilli; o Bacillales; f Bacillales Incertae XI; g Gemella. **2:** k Bacteria; p Firmicutes; c Clostridia; o Clostridiales; f Lachnospiraceae; g Coprococcus. **3:** k Bacteria; p Proteobacteria; c Deltaproteobacteria; o Desulfovibrionales; f Desulfovibrionaceae; g Desulfovibrio. **4:** k Bacteria; p Actinobacteria; c Actinobacteria; o Coriobacteriales; f Coriobacteriaceae; g Asaccharobacter. **5:** k Bacteria; p Actinobacteria; c Actinobacteria; o Coriobacteriales; f Coriobacteriaceae; g Atopobium. **6:** k Bacteria; p Fusobacteria; c Fusobacteria; o Fusobacteriales; f Fusobacteriaceae; g Fusobacterium. **7:** k Bacteria; p Proteobacteria; c Epsilonproteobacteria; o Campylobacteriales; f Campylobacter. **8:** k Bacteria; p Firmicutes; c Bacilli; o Lactobacillales; f Streptococcaceae; g Streptococcus. **9:** k Bacteria; p Bacteroidetes; c Bacteroidia; o Bacteroidales; f Prevotellaceae; g unclassified. **10:** Bacteria; p Firmicutes; c Clostridia; o Clostridiales; f unclassified; g unclassified.

5. Discussão

A casuística do presente estudo contemplou apenas mulheres, para a obtenção de uma população homogênea, sendo que o DGYR é um procedimento mais indicado a mulheres que a homens na instituição principal do estudo. Todas eram obesas graves e tiveram o diagnóstico de diabetes tipo 2 confirmado, conforme os objetivos do projeto em avaliar o efeito metabólico da DGYR na remissão do diabetes e sua possível correlação com a microbiota intestinal.

Os resultados do presente estudo indicaram a melhora da composição corporal e de variáveis laboratoriais metabólicas após três meses de DGYR, os quais são compatíveis com a literatura pertinente.^{21,42} Assim, ocorreu a redução significativa de IMC, acompanhada de perda de gordura e ganho de percentual de massa magra corporal, associados à melhora de marcadores metabólicos e RTDM2 em 57,1% das pacientes. Esses benefícios foram vistos em paralelo com mudanças precoces na composição da microbiota intestinal, caracterizadas principalmente por aumento da riqueza quando avaliada por gênero, e este quadro persistiu por até um ano após a intervenção. Esses dados estão em concordância com investigações prévias.^{21,42,43}

Com o objetivo de encontrar um valor preditivo da RTDM, o perfil da microbiota intestinal nos pacientes com RTDM e SRTDM foi investigado.

Diferenças no perfil bacteriano intestinal pré-operatório nas pacientes com remissão total do diabetes foram encontradas nos gêneros listados a seguir, com níveis mais elevados de *Gemella*, *Coprococcus* e *Desulfovibrio*, e diminuição dos níveis de *Assaccharobacter* e *Atopobium*, comparados àqueles que não obtiveram esse benefício.

O presente estudo não foi o único a encontrar diferença na microbiota entre os pacientes com RTDM e SRTDM. Furret e cols, identificou diferenças na microbiota antes e depois da DGYR e identificou no pré-operatório níveis de *F. prausnitizii* diminuídos nos pacientes com DM2 e houve um aumento após a DGYR, quando já tinham atingido a RTDM.³⁰ O autor conclui que o *F. prausnitizii* pode estar associado à redução da inflamação crônica encontrada nos obesos e diabéticos de maneira independente da dieta consumida.³⁰

Murphy e cols, estudou quatorze mulheres obesas diabéticas nos períodos pré e pós 1 ano de DGYR. No momento pré-operatório, foi encontrado aumento do gênero *Desulfovibrio* nas mulheres que não tiveram RTDM. Esse resultado difere do encontrado no presente estudo, onde a mesma bactéria estava aumentada no grupo que atingiu a RTDM.⁶²

Como o número de pacientes investigados nos dois trabalhos e a metodologia utilizada foi similar, a discrepância dos achados pode ser atribuída à localização geográfica das populações estudadas, Brasil e Nova Zelândia, o qual certamente envolve diferença de hábitos alimentares. A média de consumo de carne vermelha e gordura animal na Nova Zelândia parece ser maior que a de pacientes de um hospital público no Brasil.⁶³ Adicionalmente, a microbiota de diferentes regiões é distinta, como foi observado através de marcadores metagenômicos para DM2 de chineses e europeus.⁸

O gênero de bactéria *Desulfovibrio* pertencente ao filo das Proteobactérias, parece estar associado com a ingestão de uma dieta rica em gordura e com doenças metabólicas.⁶⁴ Um estudo experimental, realizado com camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, mostrou um

aumento significativo de *Desulfovibrio*, o qual estava associado a mudanças funcionais na barreira intestinal e na produção de peptídios microbianos.⁶⁵

É possível que a *Desulfovibrio* pode estar relacionada com disbiose e consumo de dieta rica em gordura. Nesse caso, a DGYR pode ter alterado a microbiota intestinal e causado redução nos níveis de *Desulfovibrio*, o que pode ter contribuído com a RTDM.

Os achados do presente estudo estão de acordo com os de Yassour e cols, sugerindo que mudanças na microbiota intestinal podem ocorrer antes de mesmo do início do desenvolvimento da DM2 sendo assim, um potencial marcador para o diagnóstico precoce da doença. A mesma teoria poderia ser utilizada para o diagnóstico precoce de RTDM e resposta à cirurgia.⁶⁶

Como ocorreu com a maioria dos pesquisadores, este estudo também encontrou após DGYR um aumento de bactérias pertencentes ao filo de Proteobacteria, o que parece ser consenso.^{31,62,67}

Embora alguns trabalhos mostrassem associação de Proteobacteria com maior resistência à insulina e consumo de dieta rica em gordura, não foi encontrado nenhuma relação desse filo com IMC, peso, composição corporal e exames bioquímicos, achados compatíveis a outras pesquisas.^{42,67,68} Uma possível explicação para aumento de Proteobacteria após DGYR envolve mudanças de pH e oxigenação no lúmen intestinal, modificação de mastigação fluxo biliar e digestão dos alimentos, que são condições favoráveis para o crescimento de Enterobacteria.^{64,69}

Em compatibilidade com este projeto, Murphy e cols, também observaram elevação do nível de bactérias dos filos Firmicutes e Actinobactéria após três meses de DGYR.⁶² No entanto, nem todos os estudos do tema

encontraram aumento de Firmicutes, e sim o oposto, a diminuição dele após a cirurgia.^{27,31}

Entretanto, no presente projeto, a razão de Firmicutes/Bacteroidetes diminuiu significativamente após a DGYR.

Alguns pesquisadores investigaram o papel da microbiota na obesidade e relataram associação do aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes com o fenótipo de obesidade.^{9,70,71} Dentre eles, um estudo conduzido na Ucrânia em adultos verificou uma relação entre a razão Firmicutes/Bacteroidetes e o IMC, em que o aumento do IMC aumentava a r F/B.⁷¹ O presente estudo não observou alteração significativa pós-operatória (3 e 12 meses) na quantidade microbiana pertencente aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, mas foi verificada a diminuição significativa da razão Firmicutes/Bacteroidetes após 12 meses de DGYR. Essa redução após a cirurgia foi anteriormente descrita e relacionada com a perda de peso e melhora metabólica, embora essa associação ainda seja controversa.^{9,27,30,42}

No presente estudo foi encontrado aumento na riqueza da microbiota pós DGYR, o qual está em concordância com observações anteriores.^{20,21,39,66}

O aumento de riqueza da microbiota após a cirurgia, em função de mudanças anatômicas operatórias ou de seu efeito metabólico é vantajoso, independente de outros fatores. Diversos estudos mostraram que uma microbiota intestinal com maior diversidade está relacionada com melhora metabólica, como menores níveis de glicemia e triglicérides; melhor resposta à dieta; menor índice de doenças inflamatórias entre outros benefícios.^{20,30}

Este estudo se destaca ao sugerir que o aumento da riqueza da microbiota pode ser potencializado com mudanças na ingestão alimentar após

DGYR, principalmente com o maior consumo de fibras e diminuição do consumo de lipídeos.

Analisando a dieta individual das pacientes, foi observado que a diminuição da ingestão de lipídeos após a DGYR foi associada ao aumento da riqueza da microbiota, especialmente quando as pacientes consumiam concomitantemente maior quantidade de fibras. Essa associação prevaleceu até 12 meses após DGYR. De fato, outros estudos também verificaram o impacto da ingestão alimentar sobre a riqueza e composição da microbiota.^{28,34} Tap e cols, encontraram relação entre maior ingestão de fibra e aumento da riqueza da microbiota.⁷² O aumento do consumo de fibras avaliado individualmente no período pós-operatório revelou aumento da riqueza microbiana, além do aumento provocado pelo efeito da cirurgia. Assim, o consumo de fibras pode potencializar o efeito benéfico da cirurgia, e isso tem importância para a orientação nutricional do paciente, sugerindo que há necessidade de mudança de hábitos alimentares no pós-operatório. Até onde foi possível averiguar, o presente estudo é o primeiro a correlacionar dados de microbiota com a ingestão alimentar no pós-operatório de DGYR.

Outro dado resultante das análises de riqueza da microbiota e ingestão alimentar foi a correlação inversa da riqueza da microbiota com o consumo de vitamina B12 provenientes da dieta. Foi encontrado que, quanto maior o consumo dessa vitamina, menor era a riqueza da microbiota. Essa observação pode parecer curiosa, mas a fonte alimentar de B12 em nossas pacientes foi principalmente proveniente da ingestão de fígado de boi, que vem acompanhada de gordura. Por sua vez, como foi demonstrado, o consumo de lipídeos teve correlação inversa com a riqueza da microbiota, justificando essa

relação inversa envolvendo a vitamina B12. Nenhum estudo na literatura correlacionou a injeção de vitamina B12 com a riqueza da microbiota, e é conhecido que a absorção de vitamina B12 fica prejudicada pela alteração anatômica após a DGYR, o qual altera o fator intrínseco.⁷³ Outra hipótese é que a presença da vitamina B12 no intestino por falta de absorção pode alterar a microbiota.

O presente estudo teve algumas limitações. O tempo de acompanhamento após a DGYR foi relativamente curto e o número de pacientes incluídos principalmente aos 12 meses após a cirurgia foi discreto. Outros trabalhos que exploraram essa temática, acompanharam os doentes no período pós-operatório por 3 meses até um ano da cirurgia. Um único estudo avaliou a microbiota intestinal após 9 anos da cirurgia, mas não apresentou dados pré-operatórios.³⁴ Em relação aos tempos de acompanhamento das pacientes, este trabalho se equipara às demais investigações.^{27,30,42,43,62}

O mesmo ocorre com o número de pacientes estudados. As publicações mostram casuísticas que variam de 3 a 30 pacientes, o que mostra uma compatibilidade do presente estudo com a literatura.^{7-9,13,17,20}

Outro fator limitante foi a falta de um grupo controle, o qual deveria ser representado por pacientes obesos e diabéticos, que não foram submetidos à DGYR e com dieta rica em fibra.

A inclusão desse grupo nas análises daria a possibilidade de determinar se as mudanças na microbiota intestinal ocorreram devido à cirurgia em si ou devido à ingestão de fibras. Entretanto, o presente estudo foi parte de um projeto temático SURMETAGUT, o qual apresentava metodologia previamente estabelecida, que não incluía um grupo controle.⁴⁶

Outra limitação encontrada refere-se aos métodos de avaliação da ingestão alimentar. Existe uma dificuldade em controlar a dieta dos participantes. A prevalência estimada de SRIE foi de 62,8% na população desta pesquisa. Esse valor era esperado, pois a prevalência de SRIE costuma ser maior em coortes de obesidade e mulheres como mostrado anteriormente.⁵¹

Além disso, os hábitos alimentares foram coletados por recordatório alimentar de sete dias, em que as pacientes anotavam os alimentos que foram consumidos e as quantidades. Esses dados foram calculados com a ajuda de software específico. É possível que os métodos para coleta de dados e cálculos pelo *software* possam conter falhas.⁴⁹

Em suma, os achados deste estudo confirmaram que as mudanças na microbiota fecal após DGYR levaram a um aumento na riqueza da microbiota e alterações nos gêneros de bactérias. A riqueza foi associada com o consumo de fibra após a cirurgia, mas a ingestão de lipídeos levou a uma redução na riqueza da microbiota. Também foi demonstrado o potencial do perfil da microbiota no pré-operatório em prever a remissão total do diabetes após a DGYR. Esses resultados são muito importantes na prática clínica, pois ampliam o olhar à microbiota, podendo ser usada como uma ferramenta no tratamento do paciente. Pesquisadores e clínicos podem levar em consideração no cuidado do paciente a microbiota intestinal como um potencial marcador de remissão total do diabetes em estudos futuros.

Para aprofundar as investigações desses resultados e da interação do microbioma com o metabolismo de seu hospedeiro, este estudo será continuado. Os pacientes prosseguem em seguimento ambulatorial, de forma que alguns deles já completaram três anos de acompanhamento pós-

operatório. Além disso, o protocolo continua a incluir pacientes a fim de aumentar a casuística para futuras pesquisas.

6. Conclusões

Nas condições da presente pesquisa, em mulheres obesas graves e portadoras de diabetes tipo 2, submetidas a derivação gástrica em Y de Roux podemos concluir que:

- Ocorrem, após DGYR, mudanças precoces no perfil da microbiota intestinal, em termos de composição e aumento de riqueza bacteriana.
- As mudanças precoces da microbiota intestinal após DGYR se mantêm ao longo de um ano.
- Hábitos alimentares - modificam a microbiota fecal.
- A microbiota intestinal pré-operatória de pacientes que obtiveram remissão total de diabetes tipo 2 é distinta daquelas que não obtiveram remissão total.
- O perfil da microbiota intestinal no pré-operatório, mostrou ter um potencial preditivo para a remissão total do DM2

7. Anexos

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas FMUSP em 2016

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES GÁSTRICOS E INTESTINAIS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX

Pesquisador: Dan Linetzky Waitzberg

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 5

CAAE: 19339913.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Carta Desmembramento

Justificativa: São Paulo, 01 de Abril de 2016

Data do Envio: 01/04/2016

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.482.754

Apresentação da Notificação:

Em primeiro de abril o pesquisador solicita desmembramento do projeto em execução

Objetivo da Notificação:

Inclusão desubprojeto, para fins de TESE de MESTRADO, tendo como Orientador Responsável: Prof. Dan Linetzky Waitzberg e a pesquisadora executante: Karina Al Assal.

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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 ☒
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 líquida 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

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.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador

Anexo C – Publicações relacionadas a esse projeto

- **Sala PC**, Giliane B., et al. Design and rationale of the SURMetaGut Study: A prospective clinical trial to identify the gut's role in metabolic and molecular changes after roux-en-Y gastric bypass surgery on the remission of obesity-associated metabolic dysfunction. J Int Med Res. 2016 Dec;44(6):1359-1375⁶²

Anexo D – Apresentações de resultados em congressos

Pôster apresentado no congresso ASPEN:

Anexo E – Prêmio Preprosim 2017:

8. Referências

1. Ades PA, Savage PD. Obesity in coronary heart disease: An unaddressed behavioral risk factor. *Prev Med (Baltim)*. 2017;104:117–9.
2. Kaplan JL, Walker WA. Early gut colonization and subsequent obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:278–84.
3. World Health Organization. WHO. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2016.
4. Ministério da Saúde. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Brasília; 2010.
5. Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blottière HM, Franks PW, Gunter M, et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control*. 2017;28:247–58.
6. Nam Han Cho (chair), Joes Kirigia JC, Mbanya, Katherine Ogurstova LG, Wolfgang Rathmann, Gojka Roglic NF, Rana Dajani, Alireza Esteghamati, Edward Boyko I, Hambleton, Otaliba Libânio de Moraes Neto P, Aschner Montoya, Shashank Joshi JC, et al. *IDF Diabetes Atlas 2017*. 2017.
7. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*. 2012;7:91–109.
8. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498:99–103.
9. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:1022–3.
10. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009;9:123.
11. Lang JM, Eisen JA, Zivkovic AM. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ*. 2014;2:e659.
12. Raymond F, Ouameur AA, Déraspe M, Iqbal N, Gingras H, Dridi B, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J*. 2016;10:707–20.
13. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut

- microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59–65.
14. Lopez-Legarrea P, Fuller NR, Zulet MA, Martinez JA, Caterson ID. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2014;23:360–8.
 15. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:590–8.
 16. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EMM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25:4–15.
 17. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (80-). 2011;334:105–8.
 18. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19:2317–23.
 19. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761–72.
 20. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:11070–5.
 21. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500:541–6.
 22. Kang D-W, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, LaBaer J, Adams JB, et al. Reduced Incidence of *Prevotella* and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. Gilbert JA, editor. *PLoS One*. 2013;8:e68322.
 23. Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe*. 2013;24:117–20.
 24. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreassen AS, Pedersen BK, et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. Bereswill S, editor. *PLoS One*. 2010;5:e9085.
 25. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*.

- 2013;19:576–85.
26. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J Obes.* 2016;2016:1–27.
 27. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong M-L, 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.
 28. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013;500:585–8.
 29. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457:480–4.
 30. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss: Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes.* 2010;59:3049–57.
 31. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab.* 2015;22:228–38.
 32. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:14691–6.
 33. Tehrani AB, Nezami BG, Gewirtz A, Srinivasan S. Obesity and its associated disease: a role for microbiota? *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24:305–11.
 34. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014;505:559–63.
 35. Cho J-M, Kim HJ, Menzo E Lo, 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;11:1273–80.
 36. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, et al. Effect of

- laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2003;238:467-84; discussion 84-5.
37. Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric bypass surgery. *Int J Obes.* 2009;33:S33–40.
 38. Lee W-J, Chong K, Ser K-H, Lee Y-C, Chen S-C, Chen J-C, et al. Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Surg.* 2011;146:143.
 39. 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;32:2133–5.
 40. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2365–70.
 41. Li J V., Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut.* 2011;60:1214–23.
 42. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J-L, 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.
 43. 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;8:67.
 44. Peat CM, Kleiman SC, Bulik CM, Carroll IM. The Intestinal Microbiome in Bariatric Surgery Patients. *Eur Eat Disord Rev.* 2015;23:496–503.
 45. Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, 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;5:178ra41-178ra41.
 46. Sala P, Belarmino G, Machado NM, Cardinelli CS, Al Assal K, Silva MM, 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.
 47. Monteiro JP. Consumo alimentar: visualizando porções. Guanabara Koogan; 2007. (Serie Nutrição e Metabolismo).
 48. Philippi STPP-B. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. Manole; 2012.

49. NEPA N de estudos e pesquisas em alimentação-. Tabela Brasileira de Composicao de Alimentos - TACO 4 Edicao Ampliada e Revisada. 4ª Edição. Campinas: BookEditora; 2011.
50. Committee on Use of Dietary Reference Intakes in, Nutrition Labeling, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Guiding Principles for Nutrition Labeling and Fortification.
51. Kye S, Kwon S-O, Lee S-Y, Lee J, Kim BH, Suh H-J, et al. Under-reporting of Energy Intake from 24-hour Dietary Recalls in the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2014;5:85–91.
52. Cuppari L, Schor NS. *Nutrição Clínica no Adulto*. 3ª. São Paulo: Manole; 2013. 569 p.
53. Diabetes Trials Unit : Home page [Internet]. [cited 2018 May 28]. Available from: <https://www.dtu.ox.ac.uk/>
54. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
55. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Brussel; 2006.
56. Still CD, Wood GC, Benotti P, Petrick AT, Gabrielsen J, Strodel WE, et al. Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a retrospective cohort study. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:38–45.
57. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:7537–41.
58. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:5112–20.
59. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. Gilbert JA, editor. *PLoS One*. 2011;6:e27310.
60. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and

- speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27:2194–200.
61. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:5261–7.
 62. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg*. 2017;27:917–25.
 63. Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Sci*. 84:308–13.
 64. Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33:496–503.
 65. Van Hul M, Geurts L, Plovier H, Druart C, Everard A, Ståhlman M, et al. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *Am J Physiol Metab*. 2018;314:E334–52.
 66. Yassour M, Lim MY, Yun HS, Tickle TL, Sung J, Song Y-M, et al. Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med*. 2016;8:17.
 67. Medina DA, Pedreros JP, Turiel D, Quezada N, Pimentel F, Escalona A, et al. Distinct patterns in the gut microbiota after surgical or medical therapy in obese patients. *PeerJ*. 2017;5:e3443.
 68. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2012;55:2823–34.
 69. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2009;11:2112–22.
 70. Heinsen F-A, Fangmann D, Müller N, Schulte DM, Rühlemann MC, Türk K, et al. Beneficial Effects of a Dietary Weight Loss Intervention on Human Gut Microbiome Diversity and Metabolism Are Not Sustained during Weight Maintenance. *Obes Facts*. 2016;9:379–91.
 71. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017;17:120.
 72. Tap J, Furet J-P, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, et al. Gut microbiota richness

- promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol.* 2015;17:4954–64.
73. Weng T-C, Chang C-H, Dong Y-H, Chang Y-C, Chuang L-M. Anaemia and related nutrient deficiencies after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2015;5:e006964.