

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Jéssica Lorenzzi Elkfury

**EFEITO DO USO DO SIMBIÓTICO COM *Lactobacillus paracasei* NO  
GANHO DE PESO E NA SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Porto Alegre

2015

Jéssica Lorenzzi Elkfury

**EFEITO DO USO DO SIMBIÓTICO COM *Lactobacillus paracasei* NO  
GANHO DE PESO E NA SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Departamento de Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia  
Bertoluci

Porto Alegre, 2015

#### CIP - Catalogação na Publicação

Lorenzzi Elkfury, Jéssica  
Efeito do uso do simbiótico com  
LactobacillusParacasei no ganho de peso e na  
insulinorresistência induzida por High Fat Diet em  
Ratos Wistar / Jéssica Lorenzzi Elkfury. -- 2015.  
45 f.

Orientador: Marcello Casaccia Bertoluci .  
Coorientador: Kelly Carraro Foletto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,  
2015.

1. High Fat Diet. 2. Resistência à insulina. 3.  
Microbiota intestinal. 4. Simbiótico. 5. Inflamação  
Intestinal. I. Casaccia Bertoluci , Marcello ,  
orient. II. Carraro Foletto, Kelly, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jéssica Lorenzzi Elkfury

**EFEITO DO USO DO SIMBIÓTICO COM *Lactobacillus paracasei* NO  
GANHO DE PESO E NA SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso de  
graduação apresentado como requisito parcial  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Nutrição, à Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Curso de Nutrição.

Porto Alegre, ..... de ..... de 2015.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de  
Curso intitulado "Efeito do uso do simbiótico com *lactobacillus paracasei* no ganho  
de peso e na sensibilidade à insulina em ratos wistar submetidos a uma dieta  
hiperlipídica", elaborado por Jéssica Lorenzzi Elkfury, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Maria Flávia Marques Ribeiro

---

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Carolina Guerini

---

Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci - Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo amparo espiritual e aos meus pais, pois tenho certeza que eles estão me cuidando lá de cima.

Ao meu amor, Guilherme Anflor, por todo companheirismo, amizade e paciência nestes últimos 4 anos. Agradeço também a sua família, principalmente minha sogra querida, por terem me acolhido como uma filha.

À minha avó Adelgonda, que sempre me amparou. Aos meus tios Osmar e Helena, que me receberam como se eu fosse sua filha, e as minhas primas Carol e Natália pelo companheirismo. À minha prima Thais, por ter me dado um presente maravilhoso, ser dinda do Benjamim, e a minha prima Olga por sempre estar do meu lado. À toda minha família, que de uma forma ou outra contribuiu para este momento. À todas minhas colegas e amigas da nutrição, especialmente meus presentinhos Kamila, Natasha, Scheine, Ana, Vinícius, Marina, Audrey, Roberta, Renata Pons, com certeza a faculdade foi muito mais leve e alegre tendo vocês do meu lado. Às minhas parceiras da UBS, por todas risadas e comilanças desta reta final. Às minhas musas do Champagnat por estarem presente na minha vida, e a todos meus amigos que são parte da minha base, muito obrigada!

À toda equipe CECANE, especialmente minhas ex-chefes Fernanda, Rafaela e Roberta, e ao José Leandro, por todos ensinamentos e momentos incríveis que tive a oportunidade de vivenciar. À família CEANUT pelo companheirismo. A todos meus professores, em especial às professoras Ana Beatriz, Zilda, Virgílio e Carol Guerini, que eu tive um contato mais próximo neste último ano de faculdade.

Ao meu orientador Prof. Marcelo pela confiança depositada ao decidir orientar-me; pelo incentivo, apoio, dedicação e pelo aprendizado proporcionado nesta trajetória. À minha co-orientadora Kelly, por todo apoio, principalmente nos momentos mais desafiadores. Ao Michael Andrades por toda paciência e contribuições no decorrer do meu trabalho de conclusão. As queridas Marta e Fernanda da UEA, por todo apoio e risadas no decorrer dos meus experimentos. À quase nutri Luiza Oldenburg pela parceria no desenrolar do meu projeto. À Dr. Luciana Antunes por todos ensinamentos ofertados nesta caminhada.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Alto consumo de dietas ricas em lipídios, especialmente proveniente de gordura saturada, está associado com doenças metabólicas, tais como a Resistência à insulina (RI) e dislipidemias. A RI, através do modelo de Dieta Hiperlipídica (DH), pode ser acarretada tanto pelo aumento da adiposidade visceral, quanto pela alteração da microbiota. A hipótese deste trabalho é que o uso de probióticos em modelo de DH altere tanto a endotoxemia quanto a perda de peso, resultando em uma atenuação do quadro inflamatório, ocasionando, por consequência, a atenuação da resistência à insulina. **METODOLOGIA:** Estudo experimental controlado com 36 ratos Wistar machos. Os animais foram divididos em 3 grupos: *Dieta hiperlipídica*, *Dieta hiperlipídica+ Simbiótico (Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium Lactis e FOS)* e Dieta Controle (ração Nuvital®), acompanhados por 12 semanas. Foram realizados testes de Tolerância Oral à Glicose (TOTG) e Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT). **RESULTADOS:** Não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos nem na tolerância a glicose (TOTG), nem na sensibilidade à insulina (ITT), no tempo basal, conforme esperado. Referente à tolerância à glicose, tanto na 6ª, quanto na 12ª semana o grupo controle apresentou melhor tolerância, comparado aos outros dois grupos. No que diz respeito à sensibilidade à insulina, tanto na 6ª, quanto na 12ª semana não encontramos diferenças entre os grupos DH e Dieta Hiperlipídica + simbiótico (DHS). **CONCLUSÃO:** Concluímos que ratos Wistar, submetidos a uma DHS, apresentaram resultados similares ao grupo DH, referente à tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina, ao longo das 12 semanas. O presente estudo também encontrou que o grupo suplementado com simbiótico apresentou um menor ganho de peso, comparado a DH, apesar de não ter sido encontrado diferenças na ingestão calórica.

**REVISORES:** Dieta hiperlipídica, Resistência à insulina, Microbiota intestinal, Probiótico, Prebiótico, Simbiótico, Inflamação Intestinal.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL: Ácido Graxo Livre	LAB: Bactérias formadoras ácido láctico
AKT: Proteína quinase B	LPL: Lipoproteína lipase
AndPtl-4: Angiopietin-like 4	LPS: Lipopolissacarídeo
AUC: Área sob a curva	MS: Síndrome Metabólica
CPT-1: Carnitine- O- Palmitoyl Transferase	MYD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88
DC: Dieta Controle	NFκβ: transcrição do fator nuclear-κβ
DH: Dieta Hiperlipídica	PI3-K: Fosfatidilinositol-3-cinase
DHS: Dieta Hiperlipíca + Simbiótico	PPAR-γ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
FAK: focal adhesion kinases	RI: Resistência à insulina
FOS: Frutooligossacarídeo	RP105: Proteína de superfície expressa em linfócito B que se associa ao TLR4 no reconhecimento de LPS
GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon-1	RSVG: Vírus Sincicial Respiratório
GLUT-4: Transportador de Glicose tipo 4	SCFA: Ácido graxo de cadeia curta
HCPA: Hospital de clínicas de Porto Alegre	TLR4: Toll Like Receptor-4
IKK: inibidor kappa quinase	TNF: Fator de Necrose Tumoral
IL-1R: Receptor interleucina 1	TOTG: Teste Oral de Tolerância à glicose
IL-6: Interleucina-6	UEA: Unidade de experimentação animal
IL-8: Interleucina -8	
IRS: Substrato Receptor Insulina	
ITT: Teste de Tolerância à insulina	
JNK: quinase-c Jun NH2-terminal	

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>11</b>
<b>2.1 INSULINA</b>	<b>11</b>
FISIOPATOLOGIA DA RESISTÊNCIA À INSULINA	13
<b>2.2 MICROBIOTA INTESTINAL</b>	<b>15</b>
PREBIÓTICO, PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO	16
DIETA HIPERLIPÍDICA	17
EFEITO NA PERDA DE PESO	20
<b>2.4 MAPA CONCEITUAL</b>	<b>22</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>39</b>
<b>10. REFERÊNCIAS</b>	<b>40</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O elevado consumo de dietas ricas em lipídios, especialmente proveniente de gordura saturada, está associado com doenças metabólicas, tais como a Resistência à Insulina (RI) e dislipidemias. A RI, através do modelo de dieta hiperlipídica (DH), pode ser acarretada tanto pelo aumento da adiposidade visceral, quanto pela alteração da microbiota.

O mecanismo de resistência à insulina mais conhecido ocorre através do aumento da adiposidade corporal, que resulta em maior liberação de Ácidos Graxos Livres (AGL) e citocinas inflamatórias na circulação, ocasionando um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau, resultando na RI (TSATSOUKLIS et al 2013). No entanto, alguns estudos tem demonstrado a importância do desequilíbrio da microbiota intestinal no desenvolvimento da inflamação intestinal e sistêmica, gerando, por consequência, um quadro de resistência à insulina (CANI et al., 2007; RASO et al, 2014).

A microbiota intestinal é composta por inúmeros microorganismos, que estão dispostos de maneira heterogênea no intestino (TESHIMA E, 2003). Ela é responsável pela regulação imunofisiológica no intestino, formando uma barreira contra os microorganismos invasores, potencializando os mecanismos de defesa a do hospedeiro contra os patógenos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais. Além disso, ela também compete por nutrientes intraluminais, prevenindo o estabelecimento das bactérias patogênicas (MATHAI K, 2002). Diversos fatores podem causar alterações na microbiota intestinal, como o uso de antibióticos, câncer, estresse e a dieta (ALMEIDA LB, 2008). Dentre os alimentos funcionais que geram uma alteração benéfica na microbiota estão os probióticos, prebióticos e simbióticos, que são conhecidos por aumentar a proteção da barreira intestinal, inibir a produção de bactérias patogênicas, diminuir a inflamação intestinal, além de apresentarem evidências na perda de peso (IACONO et al., 2011; ANGELAKIS et al., 2013). No entanto, existem alimentos que podem gerar uma disbiose na microbiota, como o excesso de lipídeos. O mecanismo através do qual a DH altera a microbiota, parece ser através da produção de endotoxinas na microflora intestinal, fornecendo uma condição favorável para a proliferação de bactérias gram-negativas, tais como enterobactérias intestinais (CANI et al. 2007). Além disso, a integridade da barreira intestinal prejudicada pela DH, faz

com que o Lipopolissacaríseo (LPS) que é o constituinte da barreira das bactérias gram-negativas, presente no lúmen intestinal seja liberado na lâmina própria, reagindo com seu receptor TLR4, que é uma proteína transmembrânica que forma parte do sistema imune inato, causando uma inflamação sistêmica, tendo consequências em diversos órgãos, como: fígado, tecido adiposo e músculo, contribuindo para um estado de resistência à insulina (KIM et al. 2012; YONGQING LI et al, 2011 ).

Uma vez que a DH desencadeia um processo de RI, via TLR4, é plausível cogitar que modificações na microbiota possam desempenhar um papel chave na atenuação da inflamação intestinal e por consequência na RI. Tendo em vista isso, a hipótese deste estudo é que o uso de simbiótico, contendo o probiótico *L. Paracasei* em modelo de HFD, altere tanto a endotoxemia, quanto a perda de peso, resultando em uma atenuação do quadro inflamatório, ocasionando, por consequência, a atenuação da resistência à insulina.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Insulina

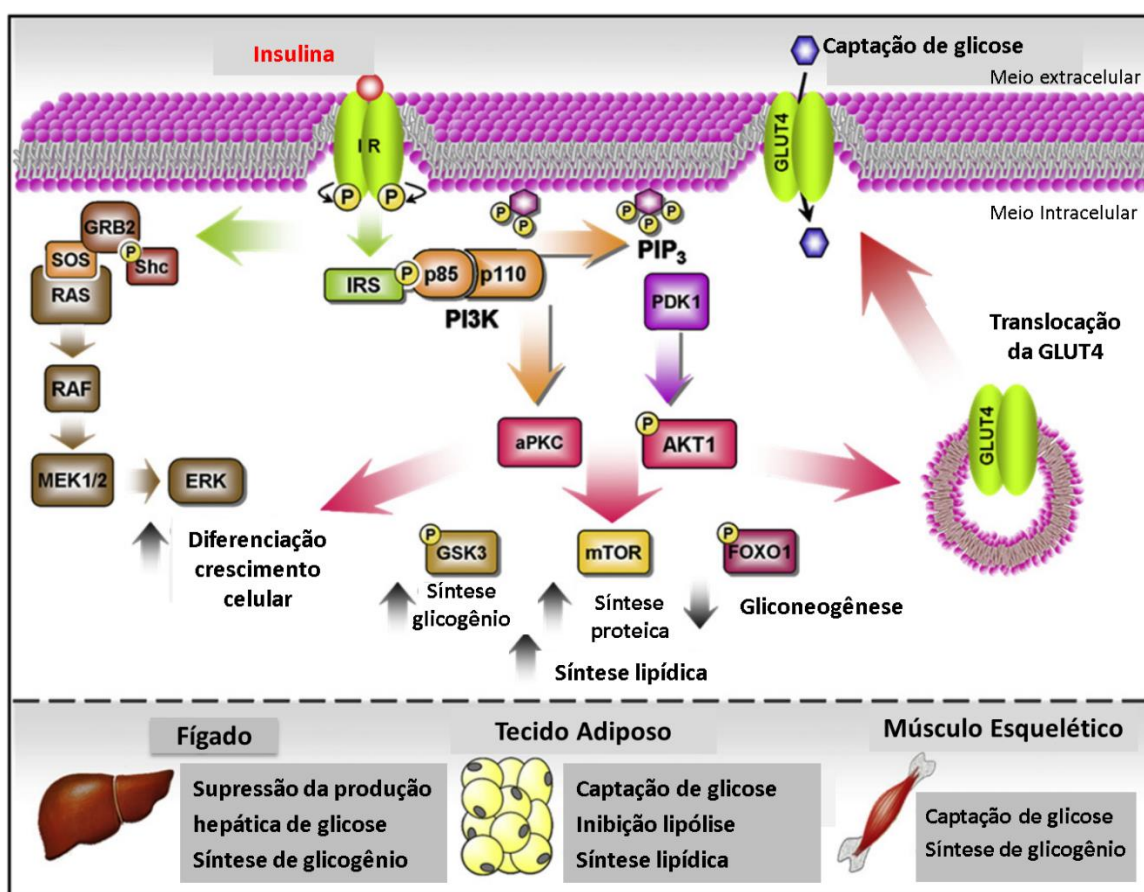
Descoberta em 1921 por Frederick G. Banting, um jovem cirurgião canadense, juntamente com Charles Best, um estudante do quarto ano de medicina que, através de um extrato pancreático bovino, diminuíram a hiperglicemia e glicosúria em cães diabéticos pancreatectomizados (BEST, 1962). Desde então, muito esforço tem sido dedicado ao entendimento do mecanismo molecular de ação deste hormônio.

A insulina é o hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase da glicose e do crescimento e diferenciação celular, sendo secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase da glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina, presente na patogenia de diversas doenças como hipertensão, dislipidemia, doença cardiovascular, obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2 (DEFRONZO; FERRANNINI, 1991; HABER et al., 2001).

A sinalização intracelular da insulina inicia-se quando esse hormônio acopla-se ao seu receptor específico de membrana, o qual é uma glicoproteína com atividade tirosina quinase intrínseca, que se autofosforila, e fosforila outras proteínas em resíduo tirosina. Como o receptor é uma tirosina quinase, ao ser ativado pela insulina, induzirá a fosforilação dos principais substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) (RONALD KAHN; GOLDFINE, 1993; TANTI et al., 1994; VAN OBBERGHEN, 1994). Subsequentemente, quando fosforilados em tirosina, os substratos de receptor de insulina (IRS) 1 e 2 ativam a via da Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-k), essencial para a síntese de glicogênio e o transporte de glicose. A ativação da PI3-k eleva a concentração de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3), intermediário que, por sua vez, ativará a proteína quinase B (Akt) (GOALSTONE et al., 1997; HAIGH et al., 1995; MEDEMA et al., 1993).

A ativação da Akt promove a translocação de uma proteína, a qual se encontra no pool citoplasmático, denominada transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), para a membrana da célula, a fim de exercer o transporte de glicose especificamente no músculo e tecido adiposo, uma vez que é nesses tecidos que há a presença de GLUT4, promovendo a captação de glicose nestes tecidos (Fig 1) (CZECH; CORVERA, 1999; MACHADO, 1998).

A insulina pode ainda favorecer o transporte de glicose em tecidos não sensíveis à insulina, simplesmente por favorecer o gradiente de concentração da glicose à medida que aumenta o consumo intracelular do substrato, por exemplo, ativando a via glicolítica em eritrócitos ou ainda a via glicolítica em hepatócitos, o que não deve ser considerado transporte sensível ao hormônio pois não envolve uma modulação diretamente no sistema transportador da glicose (MACHADO, 1998).



**Figura 1.** Vias moleculares de sinalização da insulina. Adaptado de Tsatsoulis et al., 2013.

### **Fisiopatologia da Resistência à insulina**

A RI é definida como um estado de menor resposta metabólica aos níveis circulantes de insulina e é, em geral, um processo gradual, que pode começar com o excesso de ganho de peso e a obesidade. Os mecanismos que relacionam obesidade à RI, no entanto, não estão bem elucidados. Uma provável hipótese é de que possa haver menos receptores de insulina, especialmente no músculo esquelético, no fígado e no tecido adiposo, nos indivíduos obesos do que nos eutróficos. Entretanto, a maior parte da resistência à insulina parece ser provocada por anormalidades nas vias de sinalização que ligam a ativação do receptor a diversos efeitos celulares. A alteração da sinalização da insulina parece estar intimamente relacionada com os efeitos tóxicos do acúmulo dos lipídeos nos tecidos, como músculo esquelético e fígado (GUYTON AC, HALL, 2011).

Quando os adipócitos viscerais se tornam hipertróficos, em resposta ao excesso de energia, eles se tornam disfuncionais, sofrendo lipólise mais facilmente e liberando uma grande quantidade de AGL na circulação portal. Ao mesmo tempo, eles secretam uma menor quantidade de adipocinas e adiponectinas liporregulatórias e mais citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina-6 (IL-6). Qualquer que seja o mecanismo subjacente, há duas consequências principais da disfunção do tecido adiposo: deposição de gordura ectópica e inflamação sistêmica de baixo grau, ambos contribuindo para o desenvolvimento de RI e manifestações da Síndrome Metabólica (SM) (Fig 2) (TSATSOULIS et al., 2013).

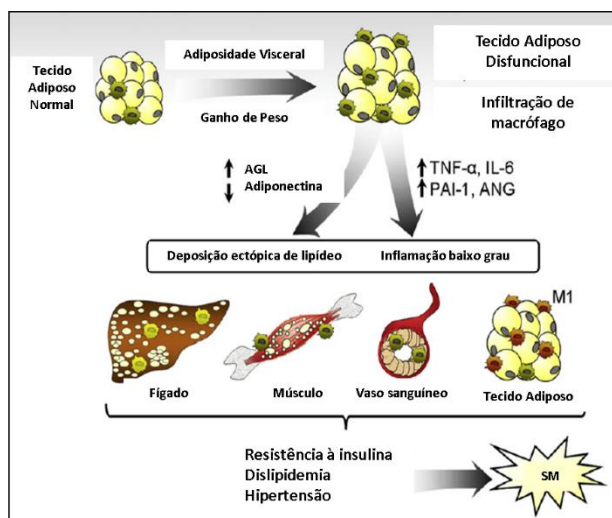


Figura 2. Expansão do tecido adiposo, resistência à insulina e síndrome metabólica. Adaptado de Tsatsoulis et al., 2013.

A elevação aguda nos níveis plasmáticos de AGL em seres humanos causa resistência à insulina pela da inibição do transporte da glicose e/ou da sua atividade de fosforilação, o que é acompanhado de uma redução tanto na taxa de síntese de glicogênio muscular, quanto na oxidação de glicose. Os mecanismos que levam os AGL a modificarem os transportadores de glicose ou sua fosforilação são desconhecidos, mas provavelmente incluem efeitos na cascata da sinalização da insulina, através do IRS-1 associado com a PI3K (Fig 3) (DRESNER et al., 1999).

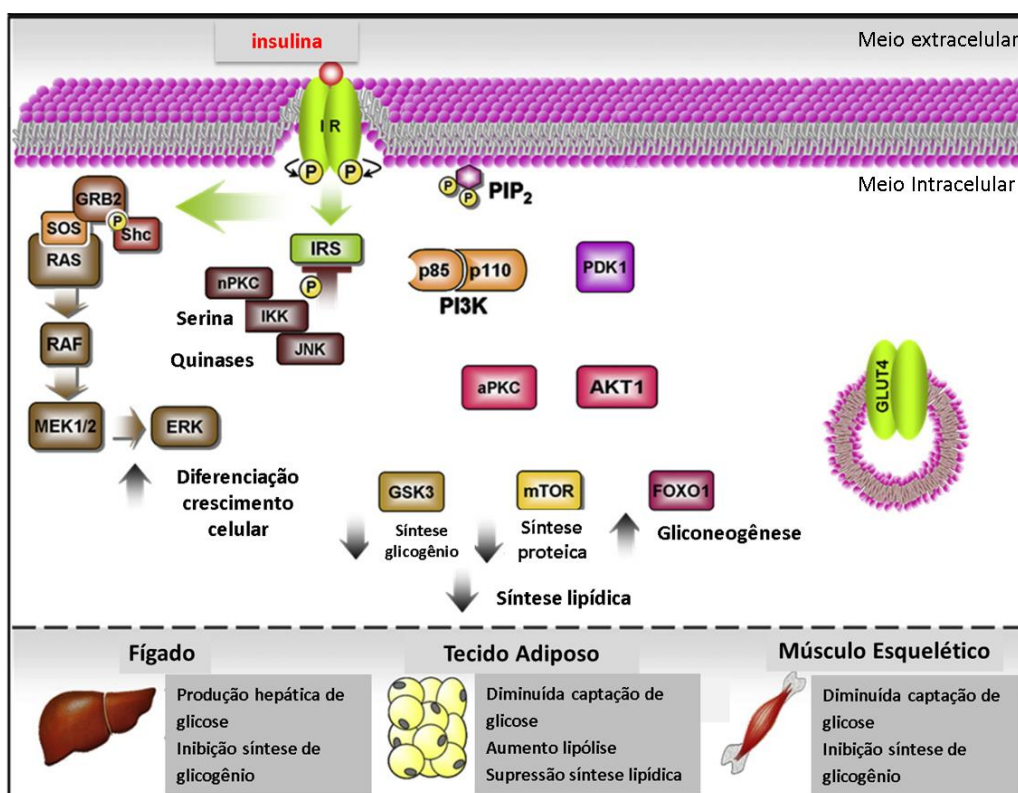


Figura 3. Fisiopatologia da resistência à insulina. Adaptado de Tsatsoulis et al., 2013.

Enquanto as células  $\beta$  do pâncreas tiverem a capacidade de compensar a resistência à insulina pela hipersecreção de insulina (hiperinsulinismo), o indivíduo consegue manter-se normoglicêmico. No entanto, a exposição das células  $\beta$  a níveis cronicamente elevados de AGL, reduzem a secreção de insulina mediada pela hiperglicemia, e, posteriormente, diminuem a massa de células  $\beta$  por mecanismos de indução da apoptose celular. Ao fim de alguns anos, os níveis permanentemente elevados de glicose e AGL levam, portanto, à chamada glicotoxicidade e lipotoxicidade pancreáticas (LEWIS et al., 2002).

A dieta é um importante fator responsável pelo desenvolvimento do quadro de RI. Um dos modelos de dieta muito utilizados em estudos experimentais é a dieta hiperlipídica (DH), onde cerca de 50% a 60% das calorias ofertadas são oriundas de alimentos fonte de ácidos graxos saturados, como a banha suína associada à ração padrão (CESARETTI; JUNIOR, 2006). JACOB et al. (2013) encontraram que a ingestão de DH aumenta a adiposidade corporal, resultando em hiperglicemia, intolerância à glicose e dislipidemia, bem como um aumento na resposta inflamatória. Além disso, DH foi associada com diminuição da fosforilação de AKT no fígado, promovendo o desenvolvimento de resistência à insulina, e o aumento da razão muscular da fosforilação IKK- $\beta$ , em resposta a um processo inflamatório neste tecido. Todos estes resultados sugerem que a ingestão isocalórica de HFD induz resistência à insulina e intolerância à glicose, o que pode ser associado com uma resposta inflamatória no músculo e com deficiências na sinalização da insulina hepática.

## **2.2 Microbiota intestinal**

Quando nascemos o nosso trato gastrointestinal é um ambiente estéril, mas após alguns meses este ambiente passa a ser colonizado por uma população microbiana estável, incluindo bactérias, fungos, bacteriófagos e vírus, os quais vivem sinergicamente com o hospedeiro (SCALDAFERRI et al., 2013). Essa população pode chegar a cerca de  $10^{14}$  células bacterianas, com mais de 2000 espécies, sendo a maior parte bactérias anaeróbicas (IACONO et al., 2011). Os filos predominantes são os Firmicutes, os Bacteroidetes, as Actinobacteria e as Proteobacteria, sendo que os dois primeiros compõem 90% da flora intestinal (DETHLEFSEN et al, 2007).

A microbiota intestinal é responsável pela regulação imunofisiológica no intestino, formando uma barreira contra os microorganismos invasores, potencializando os mecanismos de defesa a do hospedeiro contra os patógenos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais. Além disso, ela também compete por combustíveis intraluminais, prevenindo o estabelecimento das bactérias patogênicas (MATHAI K, 2002). Recentemente ela também tem sido indicada por desempenhar um importante papel na captura, armazenamento e gasto de energia (ANGELAKIS et al, 2013).

Diversos fatores podem causar alterações na microbiota intestinal, como o uso de antibióticos, câncer, estresse e a dieta (ALMEIDA LB, 2008). Dentre os alimentos funcionais que geram uma alteração benéfica na microbiota estão os probióticos, prebióticos e simbióticos, e dentre os alimentos que podem gerar uma disbiose na microbiota, estão os lipídeos em excesso.

### ***Prebiótico, probiótico e simbiótico***

Os prebióticos são substâncias alimentares que consistem fundamentalmente em polissacarídeos não-amido e oligossacarídeos mal digeridos pelas enzimas humanas e nutrem um grupo seletivo de microorganismos que povoam o intestino. Favorecendo mais a multiplicação das bactérias benéficas do que das prejudiciais (GUARNES F, 2011). Os Probióticos são microorganismos vivos, os quais, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Os principais probióticos no mercado são os lactobacilos, estreptococos e bifidobactérias, que são constituintes normais da microflora intestinal humana. Lactobacilos e estreptococos pertencem a um grupo de bactérias gram positivas denominadas LAB, produtoras de ácido lático durante a fermentação dos carboidratos, trazendo benefícios ao hospedeiro pois o ambiente ácido inibe o crescimento de bactérias gram negativas patogênicas (IACONO et al., 2011). Já os produtos simbióticos, são os que contêm tanto probióticos, como prebióticos.

O *Lactobacillus Paracasei* em particular, foi relacionado com modulação da fisiologia intestinal, para prevenir a infecção de bactérias patogênicas (SARKER, 2005), estimulação do sistema imune (IBNOU-ZEKRI et al., 2003) e por normalizar distúrbios gastrointestinais (MARTIN et al., 2006).

Dentre os principais mecanismos de ação dos probióticos estão:

#### ***- Produção de fatores antimicrobianos***

Os Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) que são produzidos durante o metabolismo anaeróbico dos carboidratos, especialmente pelas cepas de lactobacilos, auxiliando no decréscimo do pH e inibindo o crescimento de bactérias gram negativas patogênicas. Essa inibição pode ser devido à habilidade desses ácidos de passar pela membrana, deixando o ambiente intracelular mais alcalino e acidificando o citoplasma, inibindo o crescimento dessas bactérias (IACONO et al., 2011).



- *Modificação do epitélio, permeabilidade e função intestinal;*

Probióticos são capazes de aumentar o mecanismo de defesa da barreira intestinal não específica, modulando as proteínas formadoras das junções oclusivas, bem como estimulando sua produção. Esses efeitos limitam o super crescimento de bactérias intestinais e a translocação bacteriana para o plasma (IACONO et al., 2011).

- *Supressão da inflamação;*

Inflamação intestinal leva a um aumento na permeabilidade da mucosa e translocação bacteriana para o plasma. Frente a isso, os probióticos têm induzido a supressão da IL-8. Essa citocina, transcricionalmente regulada pelo NFκB, é uma potente recrutadora e ativadora de neutrófilos. Outras vias intracelulares também têm sido associados, além do NFκB, como: ativação mitogênica da proteína quinase (MAPK), proteína quinase B, ativador de proteína-1 e PPAR-γ (IACONO et al., 2011).

- *Modulação do sistema imune;*

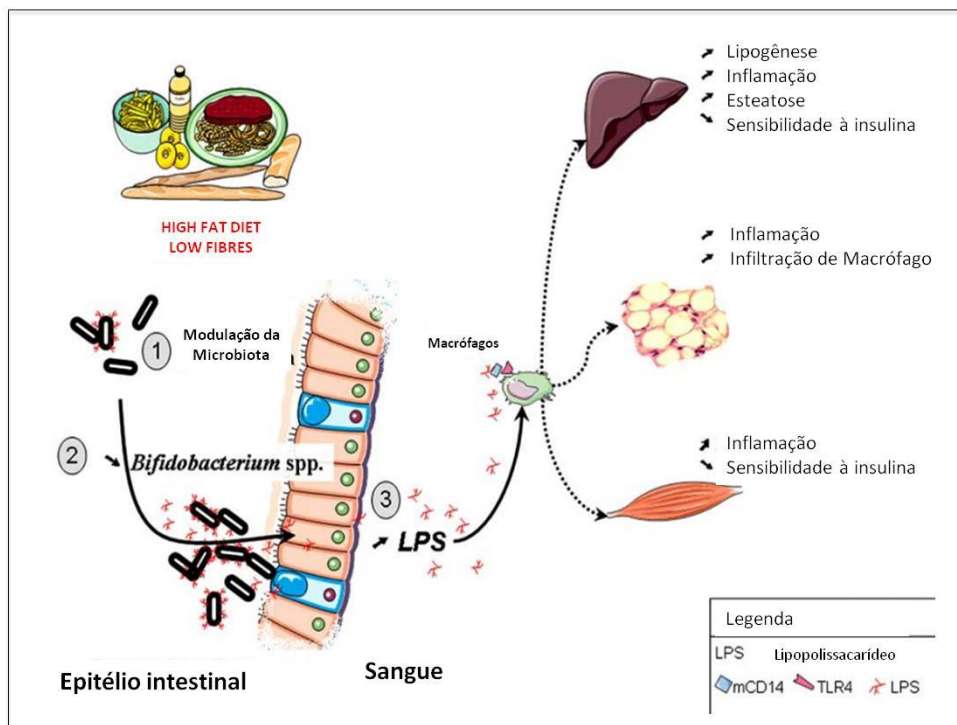
No intestino, bactérias probióticas são internalizadas pelas células M, para interagir com as células dendríticas e células do epitélio associadas, iniciando respostas imediatas pelos macrófagos e linfócitos T e B. As células dendríticas contribuem para a indução da tolerância oral, gerando células T reguladoras e IgA (IACONO et al., 2011).

### ***Dieta hiperlipídica***

A DH tem sido indicada como fator modificador da microbiota intestinal. CANI et al. (2007) em seu estudo com camundongos alimentados com DH (49,5% de lipídeos) encontraram redução das bifidobactérias, que são conhecidas por reduzir os níveis de endotoxinas intestinais e aumentar a função da barreira da mucosa. Além disso, as concentrações bifidobactéria e Lipopolissacarídeo (LPS), (determinante patogênico das bactérias gram-negativas) foram correlacionadas negativamente. Estes achados indicam que a microbiota exerce um importante papel no desenvolvimento de um quadro inflamatório via LPS (Fig 4).

KIM et al., 2012 encontraram que camundongos alimentados com DH (60% de lipídeos) apresentaram um aumento na concentração de firmicutes e redução dos bacteroidetes. Eles também encontraram níveis reduzidos de bifidobactérias, além de demonstrar um aumento no número de *Enterobacteriaceae*, que é uma família de bactérias gram-negativas. Os autores concluíram que a DH pode induzir a produção

de endotoxinas na microflora intestinal, fornecendo uma condição favorável para a proliferação de bactérias gram-negativas, tais como enterobactérias, no intestino.



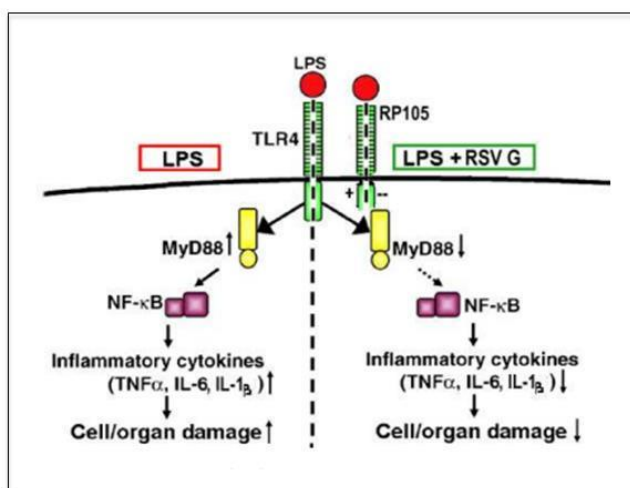
**Figura 4.** A DH causa alterações na microbiota intestinal, promovendo endotoxemia metabólica, desencadeando o desenvolvimento de alterações metabólicas, via mecanismo CD14/TLR4. (1) A dh altera a microbiota intestinal e (2) especificamente diminui *Bifidobacterium spp.* (3) Este fenômeno está associado com maior conteúdo plasmático de LPS (endotoxemia metabólica) e uma liberação dependente de LPS de citocinas próinflamatórias. DH e LPS promovem uma inflamação de baixo grau, resultando em alterações metabólicas (RI, diabetes, obesidade, esteatose, infiltração de macrófagos no tecido adiposo). Adaptado de CANI; DELZENNE, 2009.

Juntamente com a maior proliferação de bactérias gram-negativas, a permeabilidade da barreira intestinal também pode ser alterada pela DH. Essa alteração da permeabilidade da barreira pode ocorrer tanto pela redução da expressão de genes que codificam as Junções oclusivas, quanto pela ação direta do LPS, que é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, e é liberado apenas quando as células são lisadas (CANI et al., 2008; GRANDICS, 2000).

GUO S, et al. (2015) encontraram que o LPS aumenta a permeabilidade da barreira, através das junções oclusivas, além de aumentar a inflamação intestinal através da ativação do seu receptor TLR-4 que é uma proteína transmembrânica que

forma parte do sistema imune inato, causando uma inflamação sistêmica, tendo consequências em diversos órgãos, como: fígado, tecido adiposo e músculo, contribuindo para um estado de resistência à insulina (KIM et al. 2012; YONGQING LI et al, 2011 ) Fig 5.

A ativação do TLR4 possibilita, simultaneamente, a ativação da JNK e do IKK, promovendo um fenômeno unificador de resistência à insulina. O animal nocaute para TLR4 não desenvolve RI quando submetido à DH, uma vez que é capaz de ativar normalmente a Akt, (porque não consegue ativar a JNK) (CARVALHO-FILHO et al., 2006; SUGITA et al., 2002; TSUKUMO et al., 2007). O animal TLR4<sup>-/-</sup> não apresenta a ativação de NFκB, bem como ausência de alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias sistêmico e intestinal e de suas expressões no tecido adiposo (KIM et al., 2012).

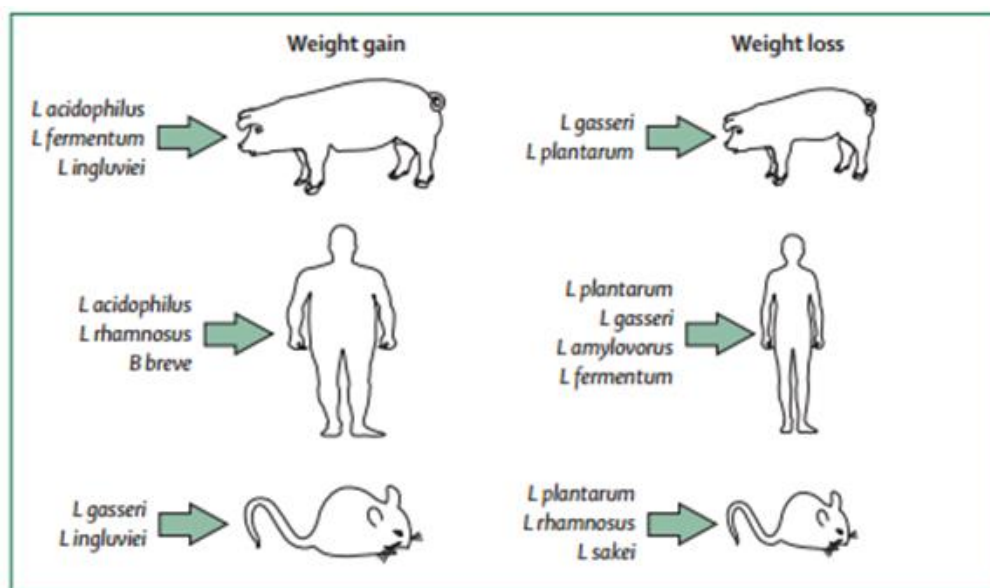


**Figura 5.** Ilustração de provável interação entre os receptores TLR4 e RP105. O receptor RP 105 seria um controlador fisiológico de TLR4, assim células RP105<sup>-/-</sup> seriam mais responsivas ao estímulo de ligantes (ex. LPS). A via da esquerda representa a ação de LPS, que ativa o fator MyD88 com consequente aumento de citocinas inflamatórias. À direita, o estímulo com LPS + proteína G do vírus sincicial respiratório interage com os receptores TLR4 e RP 105, diminuindo a ativação de MyD88, prevenindo o dano celular através da inibição de citocinas LPS dependentes (BRUM CO, 2012).

Uma vez que a DH desencadeia um processo de RI, via TLR4, é plausível cogitar que modificações na microbiota possam desempenhar um papel chave na atenuação da inflamação intestinal e por consequência na RI.

### **Efeito na perda de peso**

A microbiota intestinal desempenha uma importante papel na captura, armazenamento e gasto de energia. Modificações por antibióticos e probióticos podem tanto exercer influência no aumento, quanto na perda de peso (ANGELAKIS; MERHEJ; RAOULT, 2013). Na figura 6, estão representados alguns estudos envolvendo o papel do probiótico no peso:



**Figura 6.** Mudança no peso após intervenção de probiótico. Adaptado de (ANGELAKIS; MERHEJ; RAOULT, 2013)

O mecanismo pelo qual isso acontece não está bem claro, no entanto estudos tem mostrado que mudanças na microbiota aumentaram os níveis endógenos de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)(CANI; DEWEVER; DELZENNE, 2004)e GLP-2(CANI et al., 2009), contribuindo tanto para a sensação de saciedade (WOODS, 2004), quanto na melhora da barreira intestinal, respectivamente.

Cani (2009) traz que o provável mecanismo envolvido no ganho de peso seja através do aumento da absorção de glicose intestinal e extração de energia de alimentos não digeríveis, com concomitante maior glicemia e insulinemia, fatores metabólicos chaves na lipogênese.

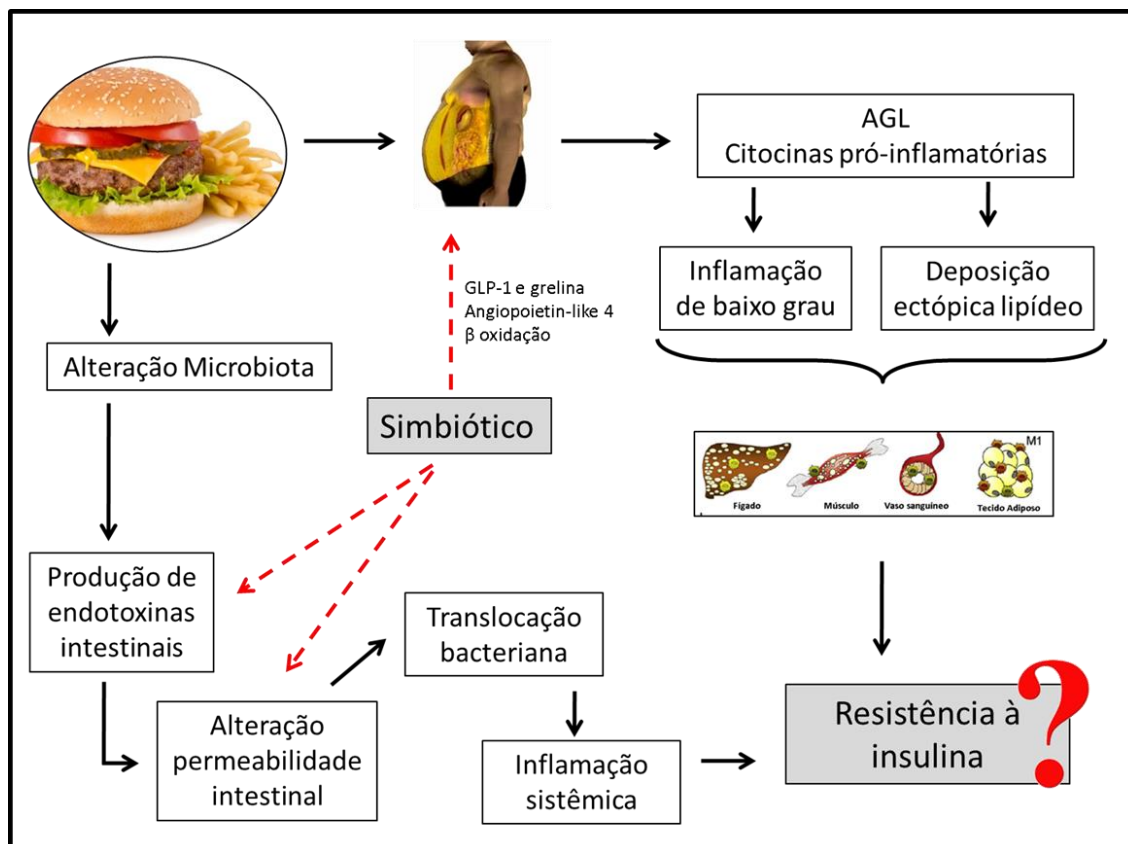
A digestão de polissacarídeos por enzimas microbianas, e a entrega aumentada de sacarídeos no fígado, participam em um aumento da lipogênese. (CANI; DELZENNE, 2009). Para confirmar essa teoria, (TURNBAUGH et al., 2006) transplantaram microbiota de camundongos magros e obesos para camundongos *germ free* e observaram que os que receberam a microbiota dos obesos, tiveram um

maior ganho de peso e extraíram mais calorias da dieta, quando comparados com o outro grupo, visto que não tiveram diferenças na ingestão calórica.

FÅK F e BÄCKHED (2012) trazem outra explicação para a diferença no ganho de peso. Os autores realizaram um experimento com camundongos submetidos a uma DH e suplementados com *L. Reuteri*. Como achado, encontraram que o grupo suplementado com probiótico teve menor ganho de peso, comparado ao DH, apesar não ter sido encontrada alteração na ingestão calórica. Como explicação, os autores excluem uma possível influência bacteriana no apetite, conforme demonstrado por alguns estudos, que encontraram aumento nas concentrações de GLP-1 e diminuição nas concentrações de grelina, em ratos wistar suplementados com FOS (CANI; DEWEVER; DELZENNE, 2004), e, então, sugerem três possíveis mecanismos: Diminuição da inflamação, que desempenha um papel na adiposidade; Aumento da expressão de Angiopietin-like 4 (Angptl4) e Alteração hepática no metabolismo de lipídeos. Angptl4 é uma proteína secretora que exerce um possível papel na regulação do metabolismo de lipídeos e na homeostase de glicose. Estudo In vitro, indicou que ela exerce um efeito inibidor na lipoproteína Lipase (LPL), que é a enzima responsável pela hidrólise das partículas de triglicérides encontradas nas partículas de lipoproteína (YOSHIDA, 2002). Somando-se a este achado, os autores também encontraram uma expressão aumentada de Carnitine O-palmitoyltransferase (Cpt1A), sugerindo aumento da  $\beta$  oxidação, tendo como consequência um aumento da sensibilidade periférica da insulina (SCHREURS; KUIPERS; VAN DER LEIJ, 2010).

Tendo em vista estes achados, podemos sugerir que a microbiota atua na regulação da adiposidade, através da regulação de mais de um ponto na rede metabólica que controla a bioenergética. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos e quais bactérias estão envolvidas no controle do peso.

## 2.4 Mapa Conceitual



## 3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a relação da resistência à insulina com diversas patologias, faz-se necessário o estudo de possíveis tratamentos, como o proposto por Raso et al, que demonstraram um efeito benéfico do simbiótico contendo *Lactobacillus paracasei* na resistência à insulina em ratos sprague dawle submetidos a uma dieta hiperlipídica. A literatura, no entanto, é bem heterogênea quanto a esses achados, provavelmente pela diferença das metodologias utilizadas. Frente a isso, o presente estudo propõe-se a reproduzir, em parte, a metodologia utilizada por Raso et al, diferindo no modelo animal, devido não ter sido encontrado na literatura nenhum estudo avaliando o efeito do simbiótico na sensibilidade a insulina em ratos Wistar sob uma dieta hiperlipídica.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

Determinar o efeito do simbiótico com *Lactobacillus paracasei* sobre o ganho de peso, glicemia e sensibilidade à insulina em ratos Wistar submetidos à Dieta Hiperlipídica por 12 semanas.

### Objetivos específicos

- Avaliar ao longo de 12 semanas:
  - Sensibilidade a insulina
  - Tolerância oral à glicose
  - Ganho cumulativo de peso

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### Delineamento

Estudo experimental controlado de 12 semanas com 36 Ratos Wistar divididos em 3 grupos:

- Dieta hiperlipídica n=12
- Dieta Hiperlipídica + intervenção (Simbiótico) n=12
- Dieta controle n=12

### Amostra:

Foram utilizados Ratos Wistar, machos, com 45 dias, hígidos, com peso entre 300 a 400g ao início dos procedimentos.

### Cálculo Amostral:

O número amostral foi calculado para obter um poder de 80%, e um nível de significância de 5%. Calculamos o tamanho da amostra através de valores de AUC do ITT de um estudo prévio do nosso grupo, o qual teve um protocolo parecido (nº projeto HCPA: 11-309). Usamos os seguintes valores:

- AUC ITT grupo controle (19 semanas de estudo): 6052.1 (6011.6 – 6746.79)
- AUC ITT grupo dieta gordurosa (19 semanas de estudo): 8122.5 (7353.5 – 8306.5)-  
Sigma: 1688.

Obtivemos uma amostra de 11 ratos. Adicionamos 10% de perdas, devido ao risco de hipoglicemia no ITT, ficando com uma amostra total de 12 ratos por grupo experimental.

**Critérios de Exclusão:**

Animais que não apresentem higidez ao longo do experimento.

**Protocolo:**

Manutenção dos animais:

Os animais foram mantidos em caixas-moradias (2 animais por caixa) com ciclo claro-escuro de 12 horas, em ambiente controlado, com temperatura entre 20-24°C e umidade relativa do ar controlada entre 40-60%. Os animais foram pesados semanalmente e a avaliação resto-ingestão foi realizado de 2 em 2 dias.

**Intervenção:**

Os animais foram randomizados segundo a AUC obtida para o ITT com auxílio do programa NCSS versão 2007, sendo que cada animal foi alocado em um dos seguintes grupos:

- Dieta Controle (DC): Ração padrão Nuvital® + 1ml água de injeção por gavagem diariamente.
- Dieta hiperlipídica (DH): Dieta hiperlipídica (45% de ração padrão (Nuvital®) + 55% de banha suína) + 1ml água de injeção por gavagem diariamente.
- Dieta hiperlipídica + Simbiótico (DHS): Dieta hiperlipídica (45% de ração padrão (Nuvital®) + 55% de banha suína) + 1ml Simbiótico por gavagem diariamente.
- Os grupos receberam a dieta por 12 semanas, para indução da resistência à insulina.
- Não houve restrição de água aos animais, sendo esta trocada diariamente. Só houve restrição de água no período de NPO (nada por via oral) prévio aos experimentos.

**Simbiótico:**

Utilizamos o simbiótico da marca Invictus, Simbiotil®, que em cada envelope (1g) contém:

- *L. paracasei*SD 5275 LPC-37® (10<sup>9</sup> UFC)



- B. Lactis SD5674 HN019® (10<sup>9</sup> UFC)
- Frutooligossacarídeo (0,9g)

A diluição de cada envelope de 1g foi em 20mL de água para injeção, e cada rato, do grupo DHS, recebeu 1mL desta diluição por dia, fazendo com que cada rato tivesse recebido 2,5x10<sup>7</sup> UFC de *L. paracasei*, conforme encontrado efeito na literatura (RASO et al., 2014).

#### **Eutanásia:**

A eutanásia foi realizada através de anestesia profunda com isofluorano (5% em 0,5ml/min de O<sub>2</sub>).

#### **Desfechos:**

##### ***Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT)***

O teste de sensibilidade à insulina (ITT) consistiu na administração de insulina intraperitoneal nos ratos submetidos a 4h de NPO e posterior avaliação da taxa de decaimento da glicose através de 4 medidas subsequentes da glicemia capilar caudal (0, 15, 30, 45 minutos). Os animais foram retirados da caixa para o procedimento, onde uma pessoa o imobilizava e a outra fazia a picada. No intervalo dos tempos o rato permaneceu livremente na caixa. Foi utilizada insulina regular (Humulin, Eli Lilly, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5UI/kg de rato e a glicemia foi avaliada através das fitas Freestyle H®. Após obtenção dos dados, a área sob a curva foi calculada pelo método trapezoidal. O ITT foi realizado em cada rato na antes da intervenção dietética, na 6<sup>a</sup> semana e na 12<sup>a</sup> semana de dieta.

##### ***Teste de Tolerância oral à glicose (TOTG)***

Para o teste de tolerância oral à glicose foi administrado, nos ratos com 8h de NPO, 1g/kg de solução de glicose oral, por única gavagem, e 3 medidas subsequentes da glicemia capilar após a administração da gavagem (0, 60, 120 minutos). O TOTG foi realizado em cada rato antes da intervenção dietética, na 6<sup>a</sup> semana e na 12<sup>a</sup> semana de dieta.

**Aspectos éticos:**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O protocolo experimental utilizado neste estudo seguiu os princípios de ética e experimentação animal, baseado na lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-2013/RN 12) e na Diretriz Brasileira de Eutanásia (CONCEA 2013/RN13) que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram planejados para minimizar dor e desconforto dos animais.

**Análise Estatística**

Para comparar as medidas temporais do TOTG (para os tempos: 0, 60 e 120 minutos) e do ITT (para os tempos: 0, 15, 30 e 45 minutos) utilizou-se ANOVA de medidas repetidas com ajuste de Bonferroni para avaliar diferenças entre o grupo de intervenção (DHS) em relação aos demais grupos dentro de cada tempo aferido. Neste teste a suposição de esfericidade foi testada por Mauchly e corrigida quando necessário.

Para o cálculo da área sob a curva (AUC) das medidas do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e do teste de sensibilidade à Insulina (ITT), foi utilizado o software NCSS® 2007 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA), calculada através do método trapezoidal.

O peso basal, ingestão alimentar (gramas e calorias de ração diária, composição de macronutrientes), AUC do TOTG e do ITT (0, 6<sup>a</sup>, e 12<sup>a</sup> semanas) foram comparados através de ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey para múltiplas comparações. Neste teste, suposições de normalidade foram testadas por Kolmogorov-Smirnov, com a correção da normalidade de Lilliefors ou Shapiro-Wilks.

O modelo linear misto (Cleophas, Zwinderman, & van Ouwerkerk, 2010; Shek & Ma, 2011; West, 2009) foi aplicado para avaliar o ganho de peso cumulativo ao longo do tempo. Nesta análise, o peso basal foi utilizado como covariável, os efeitos fixos no modelo foram os grupos e a interação grupo\*semana, indivíduos e semanas foram tratados como efeito aleatório, e foi utilizada estrutura de covariância do tipo diagonal.

Foi utilizado o programa SPSS® (IBM Corporation, Somers, NY) versão 21 para estas análises estatísticas. Os valores foram apresentados como média e erro-padrão da média (EPM) e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as análises.

## 6. Resultados

### Teste de Tolerância à Insulina (ITT) e Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)

Os animais foram randomizados e alocados de acordo com o AUC do ITT antes da intervenção da dieta, de modo a apresentarem similar variabilidade inter-grupo,  $F(2, 33) = 0,03$ ,  $p = 0,97$ . Ao compararmos dentro de cada medida de tempo, também não encontramos diferença estatística,  $F(3,23, 53,31) = 0,35$ ,  $p = 0,80$ , (Figura 1A). No início da intervenção dietética, os animais também apresentaram similaridade quanto ao TOTG dentro de cada tempo,  $F(2,91, 47,99) = 1,28$ ,  $p = 0,29$  e na AUC do TOTG,  $F(2, 33) = 0,45$ ,  $p = 0,64$  (Figura 2A).

Com seis semanas de intervenção dietética, a AUC do ITT do grupo DHS foi significativamente menor em relação ao controle,  $F(2, 33) = 7,89$ ,  $p = 0,002$ . Esta resposta glicêmica maior apareceu após 15 minutos da infusão de insulina e perdurou até o final do teste,  $F(5,04, 83,09) = 4,74$ ,  $p = 0,001$ , (Figura 1B). Já a AUC do TOTG do grupo DHS foi significativamente maior em relação ao controle,  $F(2, 33) = 8,11$ ,  $p = 0,001$ . Esta intolerância à glicose foi verificada no tempo basal e 60 minutos após a administração de glicose, normalizando 120 minutos após, (Figura 2B).

NoNa 12ª semana, a AUC do ITT do grupo DHS foi significativamente maior em relação ao controle,  $F(2, 33) = 4,84$ ,  $p = 0,014$ , no entanto não apresentou diferença comparado ao grupo DG. Ao analisarmos dentro de cada tempo seriado, pudemos verificar que os grupos que receberam DH iniciaram com uma medida glicêmica mais elevada, perdendo a significância após 15 minutos de infusão de insulina,  $F(4,13, 68,18) = 10,98$ ,  $p < .001$ , (Figura 1C).

Neste mesmo período, constatamos que a AUC do TOTG foi significativamente maior nos grupos que receberam DH,  $F(2, 33) = 22,94$ ,  $p < 0,001$ , e complementarmente verificamos que este incremento glicêmico de ~10mg/dL ocorreu durante toda a medida seriada,  $F(4, 66) = 0,46$ ,  $p = 0,76$ , (Figura 2C).

### Ganho de peso

O peso corporal não diferiu entre os grupos no início do experimento,  $F(2, 33) = 0,92$ ,  $p = .41$ ,  $(283,43 \pm 5,13)$ , (Tabela 1).

Ao longo dos 12 semanas de intervenção dietética, o ganho de peso cumulativo apresentou um efeito quadrático, que variou consideravelmente em amplitude e dimensão temporal entre os grupos,  $F(4, 188,69) = 20,83$ ,  $p < 0,001$ . O grupo DH + simbiótico apresentou ganho de peso menos pronunciado em relação ao grupo DH ( $p < 0,001$ ) e controle ( $p < 0,001$ ), (Figura 3)

### Ingestão alimentar

Não houve diferença significativa na média diária da ingestão calórica entre os grupos,  $F(2, 15) = 0,20$ ,  $p = 0,83$ .

Verificamos também que o grupo controle ingeriu significativamente mais carboidrato ( $p < 0,001$ ), mais proteína ( $p < 0,001$ ), menos lipídio ( $p < 0,001$ ) e mais fibras ( $p < 0,001$ ), comparado aos outros dois grupos, (Tabela 1).

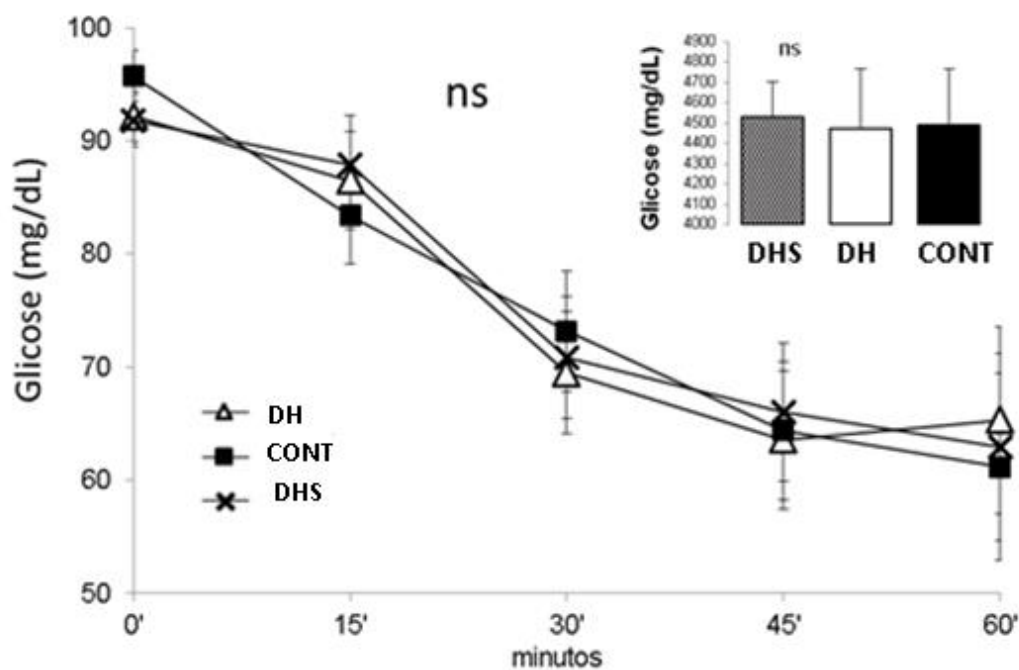
**Tabela 1. Análise do consumo e caracterização da dieta**

	DH + simbiótico (n = 12)	DH (n = 12)	Controle (n = 12)	Valor do teste
Peso Basal (g)	273,61 ± 6,38	287,38 ± 11,29	289,30 ± 8,37	<i>p</i> = 0,41
Ração (g/d)	26,21 ± .59 <sup>a</sup>	26,70 ± .89 <sup>a</sup>	48,91 ± 1.22 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,001
Ração (kcal/d)	171,09 ± 3,84	174,34 ± 5,80	170,45 ± 4,25	<i>p</i> = 0,83
Carboidrato (g)	6,49 ± 0,15 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,22 <sup>a</sup>	26,9 ± 1,64 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,001
Proteína (g)	2,59 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,09 <sup>a</sup>	10.76 ± 0,27 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,001
Lipídio (g)	14,94 ± 0,34 <sup>a</sup>	15,22 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,05 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,001
Fibra (g)	0,94 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,91 ± 0,10 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,001

Dados expressos em media ± EP. Analisado por ANOVA com teste complementar de Tukey. Diferentes letras indicam significância estatística entre as múltiplas comparações.

Abreviação: DH (Dieta hiperlipídica)

## ITT SEMANA BASAL



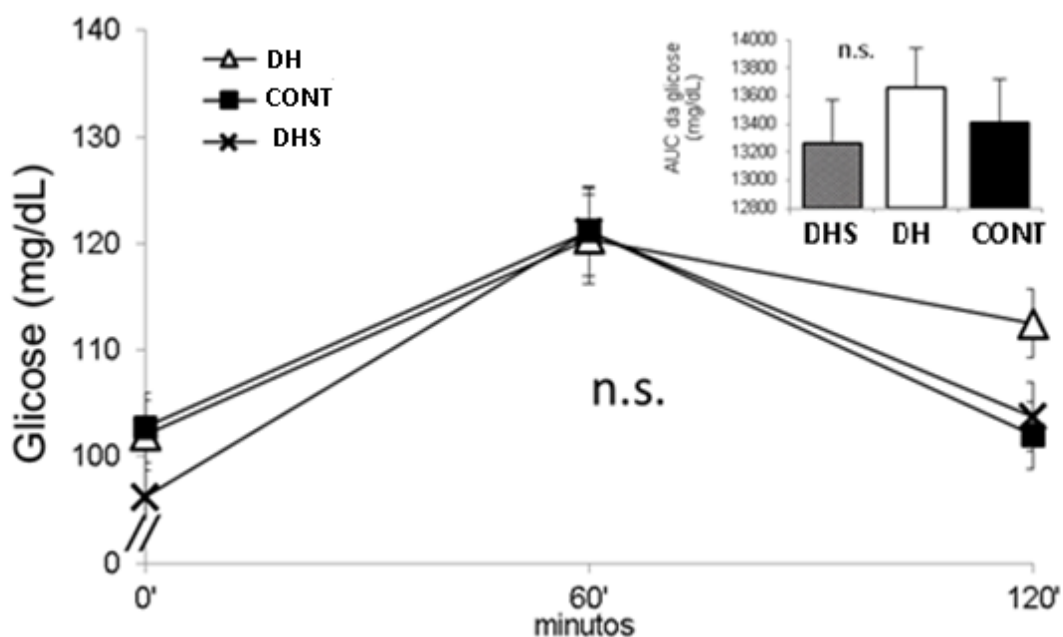
**Figura 1A:** ITT antes da intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Não houve significância estatística entre o grupo intervenção em relação ao controle e HFD,  $p=0,80$ .

Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p=0,97$

$n= 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), ITT (Teste de sensibilidade à insulina), EPM (Erro padrão médio)

## TOTG SEMANA BASAL



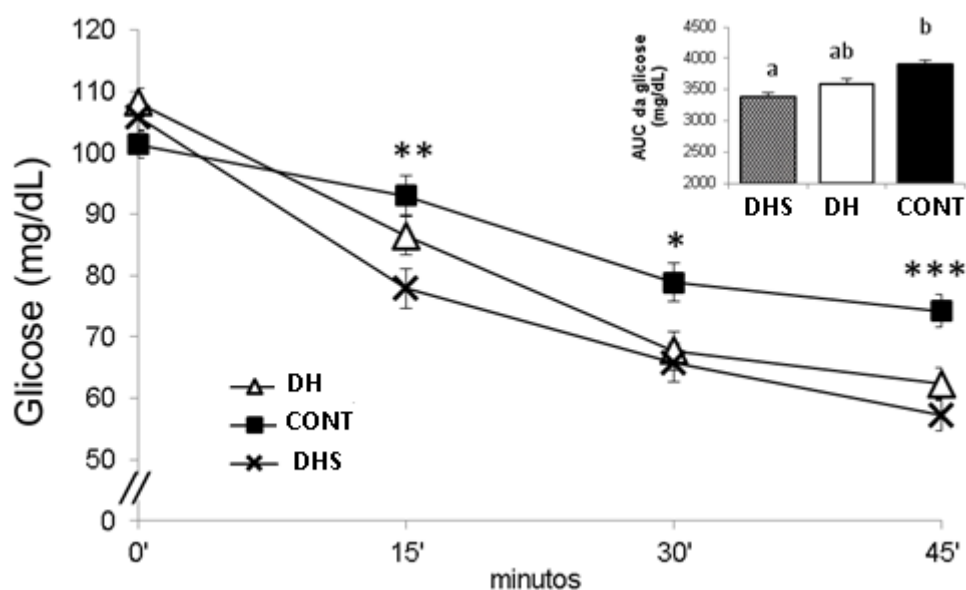
**Figura 2A:** TOTG antes da intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Não houve significância estatística entre o grupo intervenção em relação ao controle e HFD,  $p=0,29$ .

Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p=0,64$

$n= 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), TOTG (teste oral de tolerância à glicose), EPM (Erro padrão médio)

## ITT 6ª SEMANA



**Figura 1B:** ITT na 6ª semana de intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Asteriscos indicam significância estatística em relação ao grupo controle ou DH (\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,005$ , \* $p < 0,05$ ),  $p = 0,001$ .

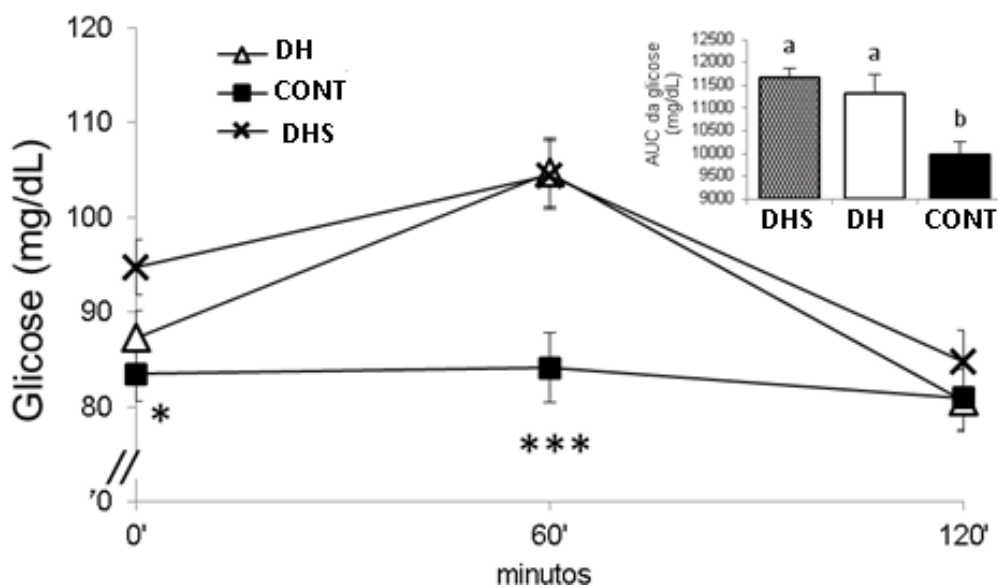
Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p = 0,97$ . Diferentes letras indicam significância estatística entre as múltiplas comparações,  $p = 0,002$

$n = 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), ITT (Teste de sensibilidade à insulina), EPM (Erro padrão médio)



## TOTG 6ª SEMANA



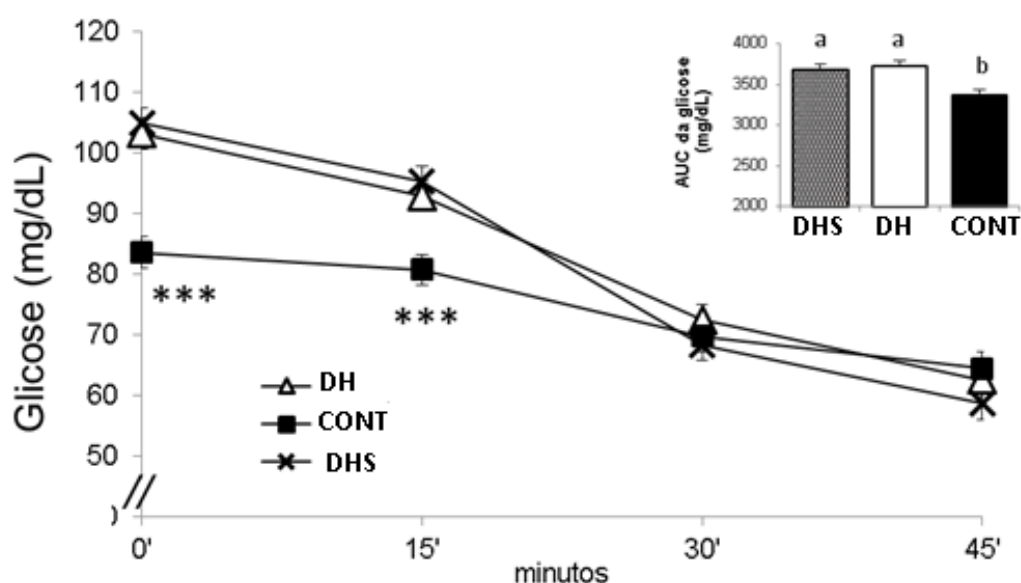
**Figura 2B:** TOTG na 6ª semana de intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Asteriscos indicam significância estatística em relação ao grupo controle ou DH (\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ ),  $p = 0,002$ .

Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p = 0,97$ . Diferentes letras indicam significância estatística entre as múltiplas comparações,  $p = 0,001$

$n = 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), TOTG (teste oral de tolerância à glicose), EPM (Erro padrão médio)

## ITT 12ª SEMANA



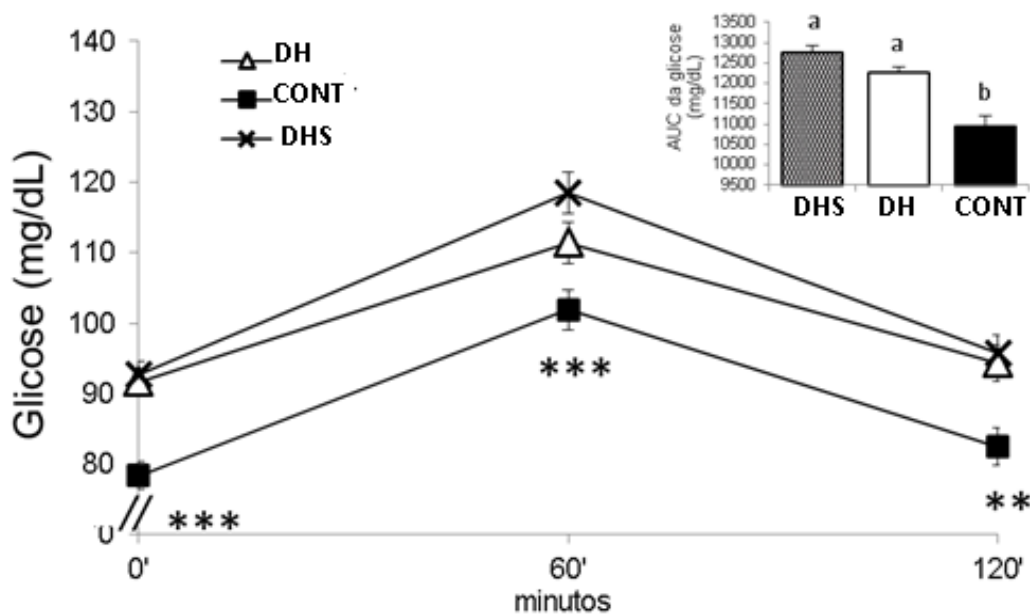
**Figura 1C:** ITT na 12ª semana de intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Asteriscos indicam significância estatística em relação ao grupo controle ou DH (\*\* $p < 0,001$ ),  $p < 0,001$ ).

Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p = 0,97$ . Diferentes letras indicam significância estatística entre as múltiplas comparações,  $p = 0,014$

$n = 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), ITT (Teste de sensibilidade à insulina), EPM (Erro padrão médio)

## TOTG 12ª SEMANA



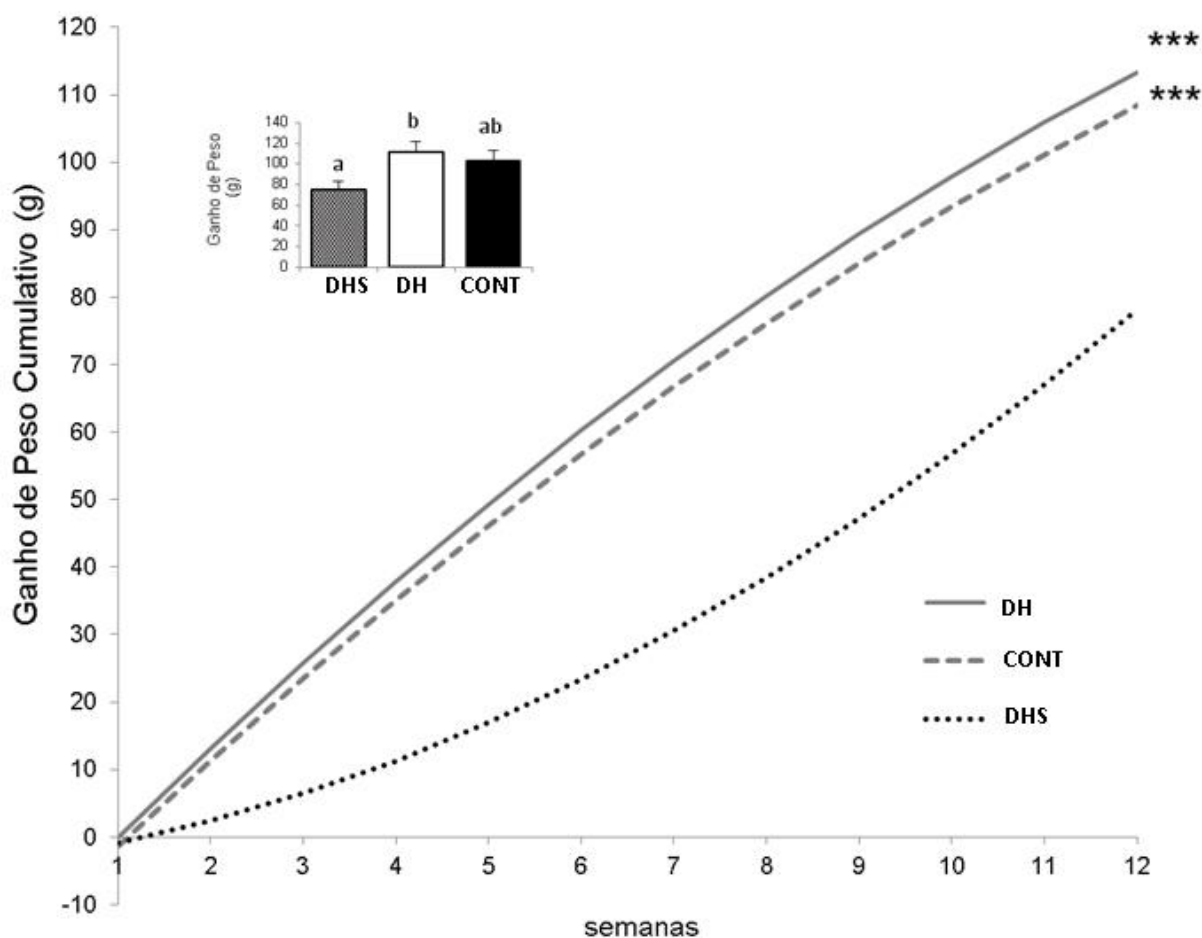
**Figura 2C:** TOTG na 12ª semana de intervenção dietética. Analisado por ANOVA de medidas repetidas. Asteriscos indicam significância estatística em relação ao grupo controle ou DH (\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,005$ ),  $p=0,76$ .

Gráfico de barras indica análises por ANOVA de uma via com teste complementar de Tukey,  $p=0,97$ . Diferentes letras indicam significância estatística entre as múltiplas comparações,  $p < 0,001$

$n= 12$  por grupo, barra de erros indica EPM

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle), TOTG (teste oral de tolerância à glicose), EPM (Erro padrão médio)

## GANHO DE PESO CUMULATIVO



**Figura 3:** Ganho de peso cumulativo (g) ao longo das 12 semanas, determinado pelo modelo linear misto com efeitos aleatórios (inclinação e intercepto) para grupos e controle do tempo, utilizando um modelo quadrático <sup>\*\*\*</sup>,  $p < 0,001$  ( $n = 12$  por grupo),  $p < 0,001$

Legenda da figura: DH (dieta hiperlipídica), DHS (Dieta hiperlipídica + simbiótico), DC (Dieta controle).

## 7. Discussão

O objetivo deste estudo, foi determinar o efeito do simbiótico com *Lactobacillus paracasei* na resistência à insulina em ratos Wistar, submetidos à *High Fat Diet* por 12 semanas. Referente aos resultados, no tempo basal não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos nem na tolerância a glicose (TOTG), nem na resistência à insulina (ITT), conforme esperado. Na 6ª semana observamos que os grupos tratados com banha, HF e HFS ainda não apresentavam resistência à insulina, mas já apresentavam intolerância à glicose, comparados ao grupo controle. Na 12ª semana encontramos que os grupos que receberam banha, HF e HFS, estavam mais resistentes à insulina e mais intolerantes a glicose, comparado ao grupo controle, e que o simbiótico não exerceu um efeito protetor na sensibilidade à insulina.

Frente a esses dados, o presente estudo traz que, ratos Wistar submetidos a uma DH + simbiótico contendo *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium Lactis* e FOS, não apresentaram alteração na sensibilidade à insulina e na tolerância oral a glicose comparados ao grupo dieta hiperlipídica. Em relação à literatura, os estudos variam muito, devido a diferença de modelos, métodos e intervenções. Alguns trabalhos realizados com camundongos ou Sprague–Dawley, submetidos a uma DH, encontraram diferenças na tolerância à glicose e/ou sensibilidade à insulina, onde os animais suplementados com pre ou probióticos tiveram uma melhor resposta. De contra partida, houveram estudos que não encontraram esse efeito, quando comparados ao grupo DH.

Fak F (2012) e Naito (2011) apresentaram em seus estudos uma metodologia muito parecida com a utilizada neste presente estudo, no entanto apresentaram resultados contrários entre si. Fak F (2012) não encontrou diferença no ITT e no TOTG nos camundongos que recebiam dieta ocidental, comparando com os que recebiam dieta ocidental + probiótico *L. Reuteri*, achados que vão de acordo com este presente estudo. Já Naito (2011) encontrou que os camundongos que recebiam dieta hiperlipídica suplementado de *L. Casei* tiveram melhores resultados no ITT e TOTG, sendo mais sensíveis e tolerantes à glicose, quando comparados com os que recebiam apenas dieta hiperlipídica.

Referente aos testes de Tolerância oral a glicose, grande maioria dos estudos utilizam o TOTG, no entanto referente a sensibilidade à insulina, as metodologias são

muito diversificadas, criando uma dificuldade de comparação entre os estudos. Cani (2007) e Respondek (2013) encontraram que os grupos suplementados com pro/prebiótico apresentaram melhores valores de tolerância oral à glicose, comparados ao grupo dieta hiperlipídica, no entanto apresentaram diferenças quanto à resposta da insulina. Raso (2014) utilizou o HOMA para verificar a resistência à insulina, e encontrou que ratos sprague-dawle submetidos a uma dieta hiperlipídica + *L. paracasei* foram mais insulinosensíveis, comparados ao grupo dieta hiperlipídica. Cani (2007) em seu estudo com camundongos que recebiam dieta hiperlipídica, suplementados com FOS e fibra solúvel demonstrou que o grupo FOS apresentava menores níveis de insulina comparados ao grupo dieta hiperlipídica. Respondek (2013) no entanto, não encontrou diferença na secreção de insulina, comparando os grupos dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica + FOS. Raso (2014).

Outro resultado encontrado no presente estudo, foi que o grupo suplementado com simbiótico apresentou um menor ganho de peso, comparado a HFD, apesar de não terem sido encontradas diferenças na ingestão calórica.

Um estudo realizado com camundongos *germ free*, alimentados com HFD encontrou que os camundongos convencionais ganharam mais peso e massa de gordura, comparados aos *germ free*. Além disso, os *germ free* tiveram proteção contra o desenvolvimento de intolerância à glicose e RI. Confirmando este resultado, em outro estudo, camundongos tratados com antibiótico não apresentaram desordens metabólicas induzidas pela HFD, apresentando melhor tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, menor peso corporal, menor ingestão energética e menor gordura visceral e subcutânea (CANI et al., 2008). Adicionalmente, (BÄCKHED et al., 2004) encontraram que camundongos *germ free* colonizados com microbiota de animais convencionais, tiveram um aumento em 60% na gordura corporal, apesar da menor ingestão calórica. Esses estudos nos trazem o possível papel da microbiota tanto para o ganho, quanto para a perda de peso.

## 8. Conclusão

Concluimos que ratos Wistar, submetidos a uma HFD + simbiótico contendo *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium Lactis* e FOS, não apresentaram alteração na sensibilidade à insulina e na tolerância oral a glicose, comparados ao grupo dieta hiperlipídica, ao longo das 12 semanas. O grupo suplementado com simbiótico apresentou menor ganho de peso, comparado ao grupo dieta hiperlipídica, apesar de não terem sido encontradas diferenças na ingestão calórica.

## 9. Perspectivas futuras

- Avaliar níveis séricos de insulina e glicose em jejum nos grupos, para posterior cálculo do HOMA-IR;
- Avaliar o efeito do uso do simbiótico com *lactobacillus paracasei* em marcadores inflamatórios: TNF-alfa;
- Avaliar o efeito do uso do simbiótico com *lactobacillus paracasei* nos níveis plasmáticos de LPS;
- Avaliar a composição microbiana do material fecal.
- Histologia do intestino e fígado

## 10. REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, LB, et al. "Disbiose intestinal." **Rev Bras Nutr Clin** 24.1 (2008): 58-65.
2. ANGELAKIS, E.; MERHEJ, V.; RAOULT, D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 10, p. 889–899, 2013.
3. BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.
4. BEST, C. H. The internal secretion of the pancreas. **Canad. Med. Ass. J.**, v. 87, n. Nov, p. 1046–1051, 1962.
5. BOMHOF, M. R. et al. Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis* on gut microbiota and glycemia in obese rats. **Obesity**, v. 22, n. 3, p. 763–771, 2014.
6. BRUM CO. A proteína de ligação do vírus sincicial respiratório inibe citocinas inflamatórias da resposta imune em um modelo de sepse induzido por lipopolissacarídeos. **[Tese de mestrado]** Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
7. CANI, P. D. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2374–2383, 2007.
8. CANI, P. D. et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470–1481, 2008.
9. CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091–1103, 2009.
10. CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. **Current Pharmaceutical Design**, p. 1546–1558, 2009.
11. CANI, P. D.; DEWEVER, C.; DELZENNE, N. M. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 03, p. 521, 2004.
12. CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da



- Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
13. CARVALHO-FILHO, M. A. et al. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 291, n. 3, p. E476–82, 1 set. 2006.
  14. CESARETTI, M. L. R.; JUNIOR, O. K. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 50.2, p. 190–197, 2006.
  15. Cleophas, T. J., Zwinderman, A. H., & van Ouwerkerk, B. Clinical Research: A Novel Approach to the Analysis of Repeated Measures. **Am J Ther**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2010
  16. CUMMINGS, D. E.; OVERDUIN, J. Gastrointestinal regulation of food intake. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 13–23, 2007.
  17. CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 4, p. 1865–1868, 1999.
  18. DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 62, n. 2, 2010.
  19. DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance : a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes care**, v. 14, n. 3, p. 173–194, 1991.
  20. DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811–818, 2007.
  21. DRESNER, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 2, p. 253–259, 1999.
  22. FÅK, F.; BÄCKHED, F. Lactobacillus reuteri Prevents Diet-Induced Obesity, but not Atherosclerosis, in a Strain Dependent Fashion in Apoe-/- Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.
  23. Food and Agriculture Organization of the United Nations. “Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.” Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and

- Nutritional . 2001.
24. GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208–215, 2006.
  25. GOALSTONE, M. et al. Insulin stimulates the phosphorylation and activity of farnesyltransferase via the ras-mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5119–5124, 1997.
  26. GUARNES F, ET AL. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia - Probiótico e Prebiótico**, 2011.
  27. GUO S, NIGHOT M, AL-SADI R, ALHMOUD T, NIGHOT P, M. T. Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. **J Immunol**, v. 195, n. Nov, p. 4999–5010, 2015.
  28. GUYTON AC, HALL, J. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: AL., Tradução Alcides Marinho Júnior et, 2011.
  29. Grandics P. Pirogênios em Produtos para uso Parenteral. **Pharmaceutical Technology**, 2000:12-6
  30. HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 1 jun. 2001.
  31. HAIGH, R. J. et al. The role of phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical Society transactions**, v. 23, n. 2, p. 179S, maio 1995.
  32. IACONO, A. et al. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 699–711, 2011.
  33. IBNOU-ZEKRI, N. et al. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 428–436, 2003.
  34. JACOB, P. S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. July, p. 244–253, 2013.
  35. KIM, K.-A. et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47713,

- jan. 2012.
36. LEWIS, G. F. et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 2, p. 201–29, 2002.
  37. MACHADO, U. F. Transportadores de Glicose. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 42, n. 6, p. 413–421, 1998.
  38. MARTIN, F. P. J. et al. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: Interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2185–2193, 2006.
  39. MARTIN, F.-P. J. et al. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial–host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 157, 2008.
  40. MATHAI K. Nutrição na idade adulta. In: Mahan LK, editor. Escott Stump S. Krause – alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ª ed. São Paulo:Roca;2002. p.261-75.
  41. MEDEMA, R. H. et al. Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 1, p. 155–62, 1993.
  42. NAITO, E. et al. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 650–657, 2011.
  43. RASO, G. M. et al. Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 81–90, jan. 2014.
  44. RESPONDEK, F. et al. Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Modulate Intestinal Microbiota and Metabolic Parameters of Humanized Gnotobiotic Diet Induced Obesity Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71026, 2013.
  45. RONALD KAHN, C.; GOLDFINE, A. B. Molecular determinants of insulin action. **Journal of diabetes and its complications**, v. 7, n. 2, p. 92–105, 1993.
  46. SARKER, S. A. *Lactobacillus paracasei* Strain ST11 Has No Effect on Rotavirus but Ameliorates the Outcome of Nonrotavirus Diarrhea in Children From Bangladesh. **Pediatrics**, v. 116, n. 2, p. e221–e228, 2005.
  47. SCALDAFERRI, F. et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

48. SCHREURS, M.; KUIPERS, F.; VAN DER LEIJ, F. R. Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 5, p. 380–388, 2010.
49. SHEK, D. T., & Ma, C. M. Longitudinal data analyses using linear mixed models in SPSS: concepts, procedures and illustrations. **ScientificWorld Journal**, 11, 42-76, 2011
50. SUGITA, H. et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 45, n. 2, p. E386–E394, 2002.
51. TANTI, J.-F. et al. Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochemical journal**, v. 304, p. 17–21, 1994.
52. TESHIMA E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: Ferreira CLLF, editor. *Prebióticos e probióticos:atualização e prospecção*. Viçosa: UFV;2003. p.35-60.
53. TSATSOULIS, A. et al. Insulin resistance: An adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment — An evolutionary perspective. **Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 622–633, 2013.
54. TSUKUMO, D. M. L. et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986–1998, 2007.
55. TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–31, 2006.
56. VAN OBBERGHEN, E. Signaling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. **Diabetologia**, v. 37, p. S125–S125, 1994.
57. WEST, B. T. Analyzing longitudinal data with the linear mixed models procedure in SPSS. **Eval Health Prof**, 32(3), 207-228, 2009
58. WOODS, S. C. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 286, n. 1, p. G7–G13, 2004.
59. YONGGING Li, ALAM HB. Modulation of Acetylation: Creating a Pro-survival and Anti-Inflammatory Phenotype in Lethal Hemorrhagic and Septic Shock. **J Biomed Biotechnol**. 2011; 2011: 1-15.

60. YOSHIDA, K. Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. **The Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 11, p. 1770–1772, 2002.
61. ZAIBI, M. S. et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. **FEBS letters**, v. 584, n. 11, p. 2381–2386, 2010.