



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Formulário
PROJETO DE PESQUISA

Processo nº (uso da PROPP/COPQ)

TÍTULO DO PROJETO:

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO RISCO CARDIOVASCULAR, INDICADORES DO ESTADO NUTRICIONAL, PARÂMETROS CLÍNICOS E SINTOMAS DE DEPRESSÃO E ANSIEDADE EM INDIVÍDUOS COM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

I – Dados pessoais do COORDENADOR

[Titulação: () Mestre (X) Doutor]

1) CPF 2) Nome completo, sem abreviação
062.583.509-33 Ricardo Fernandes

3) Matrícula SIAPE 4) Telefone(s)
1766805 (67) 98206-5755

5) Data de nascimento 6) Sexo 7) Nacionalidade 8) Endereço eletrônico
16/11/1987 (X) masc. () fem. Brasileira ricardofernandes@ufgd.edu.br

II – Origem ou local de trabalho do COORDENADOR

9) Faculdade
FCS

10) Situação funcional

(X) Docente efetivo () Técnico administrativo () Docentes permanentes de PPG *stricto sensu*
() Pesquisadores de Desenvolvimento Científico Regional/DCR () Professor Visitante – término da vigência do contrato: ____/____/____

12) Carga horária semanal destinada à execução deste projeto: 8 h

III – Enquadramento da solicitação (Leia instruções no Manual)

13) Subárea 14) Vigência 15) Solicitou ou recebeu apoio financeiro de outra instituição ou órgão?

(Tabela de áreas do conhecimento do CNPq) Nutrição – Bioquímica da Nutrição	Início: Agosto/2019 Término: Julho/2022	() Sim	(X) Não
		Órgão de fomento:	
		Valor recebido:	

16) Grupo de Pesquisa no CNPq: Alimentação & Nutrição

17) Linha de pesquisa: Estudos experimentais pré-clínicos e clínicos

18) Requer parecer do comitê de ética: () Não (X) Humanos () Animais () Bio-segurança

19) Situação atual do projeto: () Em andamento () Interrompido () Cancelado (X) Não iniciado

IV – Há outras Instituições participantes neste Projeto: (X) Sim () Não

V – Local de execução do projeto (preencher caso não seja a mesma instituição do item II)

21) Instituição (universidade, empresa, fazenda, etc.)

Hospital Evangélico Sr. e Sra. Goldsby King

22) Unidade (núcleo, departamento, laboratório, etc.)

Cardiologia

23) Cidade: Dourados

24) UF: MS

25) País: Brasil

Local	Data	Assinatura do COORDENADOR
Dourados	24.02.2019	

VI – Resumo do Projeto (Máximo 20 linhas, espaço simples entre linhas– fonte Arial tamanho 10)

Introdução: As doenças cardiovasculares estão associadas com a formação de um estado inflamatório crônico e uma disrupção metabólica e do estado nutricional. Neste contexto, vem sendo estudada a utilização de probióticos para a regularização de parâmetros imunológicos, metabólicos, do estado nutricional e relacionados à saúde mental em diferentes doenças crônicas, com resultados promissores. Contudo, destaca-se a carência de estudos em humanos sobre os benefícios dos probióticos em indivíduos com doenças cardiovasculares.

Objetivos: Avaliar o efeito da suplementação de probióticos sobre marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular, indicadores do estado nutricional, parâmetros clínicos e sintomas de depressão e ansiedade em indivíduos com doenças cardiovasculares.

Materiais e métodos: Indivíduos adultos e idosos com doenças cardiovasculares serão convidados a participar deste estudo randomizado, placebo-controlado e triplo-cego. Os participantes serão distribuídos em dois grupos: Grupo controle (placebo) e Grupo intervenção (probiótico). O estudo constará de dois momentos experimentais: M0 – momento basal; M1 – momento final, após 90 dias de suplementação. Nos momentos propostos serão realizadas a avaliação de marcadores inflamatórios e do risco cardiovascular, indicadores do estado nutricional, parâmetros clínicos e sintomas de depressão e ansiedade.

Resultados esperados: Espera-se que a suplementação de probióticos possa modular positivamente parâmetros imunológicos, metabólicos, indicadores do estado nutricional e de saúde mental em indivíduos com doenças cardiovasculares. Ainda, pretende-se inferir a aplicação dos resultados na terapêutica global destes indivíduos.

VII – Palavras-chave (Máximo três)

Doenças cardiovasculares	Inflamação	Probióticos
--------------------------	------------	-------------

VIII – Projeto de Pesquisa

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO RISCO CARDIOVASCULAR, INDICADORES DO ESTADO NUTRICIONAL, PARÂMETROS CLÍNICOS E SINTOMAS DE DEPRESSÃO E ANSIEDADE EM INDIVÍDUOS COM DOENÇAS CARDIOVASCULARES.

1. RECURSOS HUMANOS ENVOLVIDOS NO PROJETO

Nome	CPF	Instituição/Lotação	Tipo de participação	CH semanal
Ricardo Fernandes	062.583.509-33	UFGD/FCS	Coordenador	8h
Erasmio B.S.M. Trindade	240.350.763-68	UFSC/CCS	Pesquisador colaborador	3h
Marcos A. Cantero	024.513.979-69	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Macksuelle R.A. Guedes	023.771.181-86	Hospital Evangélico	Pesquisador colaborador	4h

Caroline A.S. Jorge	024.868.781-65	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	2h
Flávia M. Delgado	039.353.861-33	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Jacqueline Marceley Oliveira	359.496.388-83	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Denize A.S. Bourscheid	795.127.561.55	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Hannah Shafto	703.578.021-10	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Juliana G. dos Santos	707.732.261-09	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Ludmilla Q.T. Cabral	034.970.061-30	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Millena M. Fernandes	062.217.061-90	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h
Sofia B. Novelli	070.155.111.93	UFGD/FCS	Pesquisador colaborador	4h

2. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) continuam liderando a causa de mortes em muitos países, incluindo países em desenvolvimento, como o Brasil. A mortalidade por DCV representou 28% do total de óbitos ocorridos no Brasil entre 2010 e 2015 e atingiu 38% dos óbitos na faixa etária produtiva (18 a 65 anos). Os custos estimados por DCV foram de R\$ 37,1 bilhões de reais no ano de 2015, um aumento percentual de 17% no período de 2010 a 2015 (SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; LAND, 2017).

Evidências mostram que as doenças cardiovasculares estão fortemente ligadas a doenças metabólicas e a fatores ambientais (obesidade, diabetes *mellitus*, dislipidemia, tabagismo, sedentarismo, dietas ricas em carboidratos e lipídios), contribuindo para a formação de um estado inflamatório crônico caracterizado por concentrações alteradas de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e proteínas de fase aguda, além da ativação de vias de sinalização inflamatórias (BOULANGÉ et al., 2016; HOTAMISLIGIL, 2017). Alterações no equilíbrio imunológico podem influenciar a homeostase metabólica, interferindo no metabolismo glicídico, lipídico e hormonal. Esta disrupção imunológica e metabólica está associada com o desenvolvimento de doenças, como o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), asma, dislipidemia, câncer, contribuindo para o aumento da mortalidade (WHO, 2018).

Além dos diferentes mediadores imunológicos e metabólicos comumente envolvidos nestas doenças, evidências mostram que a microbiota intestinal exerce importante papel na patogênese das DCV. A terminologia microbiota intestinal refere-se às colônias de micro-organismos que residem no intestino dos animais, sendo composta por espécies nativas que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal e por um número variável de micro-organismos que vivem temporariamente no trato digestório (QIN et al., 2010). Em indivíduos com obesidade, há baixa diversidade no conteúdo genômico bacteriano e elevada abundância de gêneros bacterianos potencialmente pró-inflamatórios, fatores que induzem a inflamação crônica e a resistência à ação da insulina, aumentando o risco da ocorrência de DCV (LE CHATELIER et al., 2013). O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular externa de bactérias gram-negativas, também tem sido apontado como um dos principais ativadores do processo inflamatório. Esse componente é excessivamente absorvido pelos capilares intestinais diante do desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose) e da falha na função da barreira intestinal, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (PCR), evento conhecido como endotoxemia metabólica (BOUTAGY et al., 2016). Esta condição está associada à redução das concentrações de bactérias benéficas na microbiota intestinal, as quais favorecem a função de barreira intestinal contra antígenos bacterianos (BOTTACINI et al., 2014).

Entre as abordagens dietoterápicas utilizadas neste contexto estão os probióticos, micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Estes micro-organismos exercem várias funções, incluindo a inibição do crescimento de bactérias patogênicas, a preservação da função da barreira epitelial, regeneração do tecido epitelial, modulação imunometabólica favorável ao hospedeiro, regulação do trânsito intestinal, síntese de ácidos graxos de cadeia curta e de vitaminas, bem como alívio da constipação, vômitos e diarreia (HILL et al., 2014; GUARNER et al., 2017). Em particular, espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido extensivamente estudados e utilizados como probióticos (NETO et al., 2018).

Bifidobactérias são bactérias gram-positivas e anaeróbias encontradas ao longo de todo o trato gastrointestinal (BOTTACINI et al., 2014). Cani et al. (2007) verificaram que entre diferentes bactérias intestinais de camundongos, diferentes espécies de bifidobactérias correlacionaram-se positivamente com a melhora da tolerância à glicose, a secreção de insulina induzida por glicose e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no tecido adiposo. Entre os benefícios das bifidobactérias observados em estudos experimentais

em indivíduos adultos, destacam-se: redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e melhora do perfil lipídico em indivíduos com síndrome metabólica (BERNINI et al., 2016) e redução da proliferação de bactérias patogênicas no intestino (ODAMAKI et al., 2012).

Lactobacilos são bactérias probióticas gram-positivas, anaeróbias facultativas ou microaerófilas (requer menor quantidade de oxigênio). Estes são amplamente encontrados em lácteos, como leite fermentado, iogurte e queijo (DICERBO et al., 2016). Entre os benefícios dos lactobacilos observados em indivíduos adultos, destacam-se: redução do colesterol total e LDL-colesterol (FUENTES et al., 2013), imunomodulação (IEMOLI et al., 2012), melhora da constipação (HIGASHIKAWA et al., 2010), da diarreia (DIETRICH; KOTTMANN; ALAVI, 2014), do perfil glicêmico e da atividade antioxidante no DM2 (ASEMI et al., 2013).

A microbiota intestinal pode também interagir com o sistema nervoso central por meio de vias de sinalização neural, endócrina e imunológica, coletivamente conhecidas como o “eixo intestino-cérebro”. Desordens relacionadas à saúde mental, tais como depressão e ansiedade, podem ocorrer de forma concomitante a doenças metabólicas. A microbiota intestinal tem sido investigada como importante meio de modulação de desordens mentais em modelos animais, embora poucos estudos tenham investigado a relação entre o consumo de probióticos em humanos com doenças crônicas e sintomas de depressão e ansiedade (PIRBABLOU et al., 2016). Diferentes mecanismos têm sido implicados para a melhora de sintomas depressivos e de ansiedade em doenças crônicas a partir do uso de probióticos, com destaque para a modulação da composição da microbiota intestinal e a produção subsequente de substâncias neuroativas que podem auxiliar na modulação comportamental (LIANG; WU; JIN, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de todos os benefícios observados com o uso de probióticos, a utilização destes produtos alimentares vem sendo pouco explorada como uma nova proposta terapêutica para a regularização da microbiota intestinal, de parâmetros imunometabólicos e da melhora de sintomas relacionados à depressão e ansiedade em indivíduos com DCV (COSTANZA et al., 2015; RAYGAN et al., 2018). Por outro lado, revisões sistemáticas têm mostrado efeitos benéficos e significativos em seres humanos com fatores de risco cardiovasculares, tais como obesidade, síndrome metabólica, dislipidemia e DM2 (BESERRA et al., 2015, SUN; BUYS, 2015; FERNANDES et al., 2017; HENDIJANI; AKBARI, 2018).

Considerando os efeitos benéficos dos probióticos na saúde humana e o limitado número de estudos com alta qualidade metodológica que avaliaram o efeito deste produto alimentar em seres humanos com DCV, destaca-se a necessidade de maior número de ensaios clínicos randomizados, controlados e duplo/triplo cegos com o objetivo de avaliar o papel adjuvante dos probióticos no tratamento das DCV.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo consiste em avaliar o efeito da suplementação de probióticos em marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular, em indicadores do estado nutricional, em parâmetros clínicos e em sintomas de depressão e ansiedade em indivíduos com DCV.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de probióticos sobre marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular, indicadores do estado nutricional, parâmetros clínicos e sintomas de depressão e ansiedade em indivíduos com doenças cardiovasculares.

4.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar marcadores inflamatórios e do risco cardiovascular, antes e após a suplementação com probiótico;
- ✓ Avaliar indicadores bioquímicos do estado nutricional, antes e após a suplementação com probiótico;
- ✓ Avaliar indicadores antropométricos do estado nutricional e a força muscular, antes e após a suplementação com probiótico;
- ✓ Avaliar parâmetros clínicos, antes e após a suplementação com probiótico;
- ✓ Avaliar sintomas de depressão e ansiedade por meio da aplicação de instrumentos traduzidos e validados, antes e após a suplementação com probiótico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ensaio clínico randomizado, placebo-controlado, triplo cego, a ser realizado no Hospital Evangélico Sr. e Sra. Goldsby King, Dourados, MS.

O projeto será submetido à plataforma *Clinical Trials* (<https://clinicaltrials.gov>) para registro do ensaio clínico após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFGD.

5.2 AMOSTRA DO ESTUDO

A amostra do estudo será constituída por indivíduos adultos e idosos com doenças cardiovasculares assistidos no hospital.

Os critérios de inclusão serão: indivíduos adultos e idosos (≥ 20 anos) de ambos os sexos em tratamento clínico-ambulatorial ou cirúrgico para doença cardiovascular ou após evento coronariano agudo. Serão excluídos aqueles com: doenças gastrointestinais prévias (ex: câncer e/ou doenças inflamatórias intestinais); doença renal crônica em diálise; intolerâncias e/ou alergias alimentares (ex: intolerância à lactose e/ou doença celíaca); dependência alcoólica e/ou de drogas ilícitas; uso atual ou prévio (até um três meses) de antibióticos e/ou laxativos e/ou inibidores de apetite (aqueles que receberem antibioticoterapia profilática para tratamentos cirúrgicos não serão excluídos); uso regular de antiespasmódicos e/ou antiácidos; uso atual ou prévio (até três meses) de módulos de fibras alimentares, prebióticos, probióticos, simbióticos ou produtos enriquecidos com estes ingredientes; apresentar intolerância a prebióticos e/ou probióticos e/ou simbióticos; grávidas ou lactantes e seguimento atual de dietas não usuais (ex: vegetarianos, paleolítico, sem glúten, sem lactose e/ou macrobiótica). A elegibilidade será confirmada mediante análise do prontuário do participante e por questionamentos ao mesmo.

Entre os critérios de exclusão estão indivíduos que seguem dietas não usuais, que apresentam intolerâncias e/ou alergias alimentares e que fazem uso de fármacos ou suplementos que podem alterar diretamente o sistema imunológico, a microbiota intestinal e o apetite, uma vez que são fatores confundidores ou modificadores de efeito neste tipo de intervenção.

Como critérios de descontinuação, os participantes que ficarem por dois dias consecutivos ou mais sem consumir o suplemento. O ponto de corte de dois dias foi baseado em uma pesquisa com seres humanos que mostrou uma mudança estrutural significativa da comunidade microbiana após dois dias de uma intervenção dietética (DAVID et al., 2014). Estas alterações foram caracterizadas por mudanças na abundância relativa de grupos taxonômicos bacterianos, na atividade microbiana e na expressão gênica microbiana de vários módulos e vias metabólicas. Estes fatores acarretaram em padrões diferenciados de motilidade

gastrointestinal, mudanças nos tipos de ácidos graxos de cadeia curta produzidos, mudanças na concentração de cetonas na urina, no peso das fezes e na expressão microbiana de genes envolvidos no metabolismo da glicose e de aminoácidos.

Todos os participantes receberão a mesma educação interdisciplinar (informação e esclarecimento) sobre o tratamento não farmacológico para doenças cardiovasculares. Contudo, será orientado aos participantes do estudo que durante o período de suplementação evitem: praticar atividade física intensa; consumir bebida alcoólica e alimentos enriquecidos com prebióticos, probióticos ou simbióticos (APÊNDICE A).

Os pesquisadores realizarão a triagem dos indivíduos e, para aqueles que cumprirem os critérios de elegibilidade, será apresentada a proposta de pesquisa e efetuado o convite de participação. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ocorrerá neste mesmo momento, após leitura em conjunto (APÊNDICE B).

5.2.1 Cálculo do tamanho da amostra

Considerou-se para o cálculo amostral:

a) Dados de média e desvio padrão da PCR-us (desfecho primário da presente pesquisa) do estudo realizado por Raygan et al. (2018) que avaliaram o efeito de probióticos em diferentes parâmetros metabólicos e inflamatórios em uma amostra com doença arterial coronariana;

b) poder do estudo de 80%;

c) intervalo de confiança de 95%;

d) cálculos executados no software online OpenEpi[®].

O resultado obtido indicou tamanho amostral de 88 participantes. Considerando 20% de possíveis perdas de seguimento, o tamanho amostral obtido ficou em 106 participantes (53 por grupo). Devido ao processo de randomização estratificada por blocos (descrição completa no subitem 4.3.2), buscou-se número par e divisível por quatro dentro de cada grupo, portanto, o tamanho amostral final ficou em 112 indivíduos (56 por grupo).

Este tamanho amostral deve ser atingido para cada uma das categorias de pacientes listados abaixo:

- 1) Pacientes crônicos em tratamento clínico-ambulatorial;
- 2) Pacientes crônicos em tratamento cirúrgico;
- 3) Pacientes estáveis após evento cardiovascular agudo.

5.3 PROTOCOLO DO ESTUDO

5.3.1 Momentos do estudo

O estudo constará de dois momentos experimentais: M_0 - momento basal, início da suplementação; M_1 – momento final, 90 dias após a suplementação.

No momento basal será realizada a caracterização dos participantes (APÊNDICE C) e em todos os momentos propostos nesse estudo serão realizadas a coleta de sangue para avaliação de marcadores inflamatórios, do risco cardiovascular e de indicadores bioquímicos do estado nutricional (APÊNDICE D), de parâmetros clínicos (APÊNDICE E), de indicadores antropométricos do estado nutricional e da força muscular (APÊNDICE F) e de sintomas de ansiedade e depressão (ANEXOS A e B).

Os indivíduos sob tratamento clínico-ambulatorial serão convidados a participar da pesquisa em uma consulta ambulatorial. Os indivíduos programados para tratamento cirúrgico serão convidados a participar no momento da avaliação pré-operatória pelo médico. Aqueles após evento cardiovascular agudo serão convidados a participar um dia antes da alta hospitalar programada pela equipe médica, já com a situação clínica estabilizada. Todos deverão iniciar a suplementação no dia do convite, após leitura do TCLE em conjunto e aceite em participar da pesquisa. Especificamente naqueles indivíduos que passarão por tratamento cirúrgico, haverá o cessamento do consumo do suplemento no dia da cirurgia (respeitando o jejum pré-cirúrgico), retornando o consumo somente após a liberação médica de ingestão de líquidos ou sólidos via oral.

Os pesquisadores e colaboradores manterão contato presencial com os indivíduos em análise (quando eles se dirigirem ao hospital) ou via ligação telefônica uma vez por semana, visando o registro da adesão ao tratamento (incluindo a suplementação, tratamento farmacológico e não farmacológico).

5.3.2 Randomização e cegamento

A técnica de randomização que será adotada é do tipo estratificada por blocos adaptada a covariáveis (SURESH, 2011). Serão criados três estratos representando o tipo de paciente no estudo: 1) pacientes crônicos em tratamento clínico; 2) pacientes crônicos submetidos a tratamento cirúrgico; e 3) pacientes estáveis após evento cardiovascular agudo.

Blocos contendo quatro códigos de alocação cada (dois para o grupo intervenção e dois para o grupo controle) serão atribuídos a cada nível de um respectivo estrato. Por sua

vez, cada código do bloco de cada nível estará subordinado ao sexo do indivíduo e a presença de DM2 (covariáveis), haja vista que: 1) a literatura tem demonstrado que o sexo do indivíduo exerce influência sobre a concentração de marcadores inflamatórios circulantes (CHROUSOS, 2010); 2) indivíduos com DM2, incluindo aqueles sob tratamento farmacológico, apresentam microbiota intestinal e produção de mediadores inflamatórios substancialmente diferentes daqueles que não tem esta situação de doença (QIN et al., 2012; FORSLUND et al., 2015; CANI; JORDAN, 2018) (Tabela 1). A aleatorização na distribuição dos grupos de tratamento dentro de cada bloco entre os níveis de estrato será gerada pelo software estatístico Stata[®] v.13.1 para Windows (StataCorp, Texas, EUA).

Os participantes do estudo, bem como os pesquisadores responsáveis pelo recrutamento, coleta e análises laboratoriais, além do responsável pelo tratamento e análises estatísticas serão cegados, caracterizando o estudo como triplo-cego. Os suplementos e o placebo serão pré-embalados em sachês opacos e fechados pelo fornecedor e codificados apenas com números aleatórios correspondentes à lista de randomização, sendo idênticos em aparência física, sabor e cor.

Tabela 1 - Lista de randomização estratificada pelo tipo de paciente e adaptada a covariáveis. Exemplo.

Estratos	Nível	Covariáveis			
		Masculino com DM2	Masculino sem DM2	Feminino com DM2	Feminino sem DM2
Tratamento clínico	1	Intervenção	Controle	Controle	Intervenção
Tratamento clínico	2	Controle	Intervenção	Intervenção	Controle
Tratamento clínico	...	Intervenção	Controle	Controle	Intervenção
Tratamento cirúrgico	1	Controle	Intervenção	Intervenção	Controle
Tratamento cirúrgico	2	Intervenção	Controle	Controle	Intervenção
Tratamento cirúrgico	...	Intervenção	Controle	Controle	Intervenção
Após evento agudo	1	Controle	Intervenção	Intervenção	Controle
Após evento agudo	2	Controle	Intervenção	Intervenção	Controle
Após evento agudo	...	Intervenção	Controle	Controle	Intervenção

A identificação dos grupos (para cada nível e estrato) da lista de randomização será substituída por códigos numéricos aleatórios com oito dígitos cada, selecionados sistematicamente a partir de uma tabela de números aleatórios. Nenhum código será repetido. Estes processos de seleção dos códigos, substituição da identificação do grupo pelo respectivo código e codificação das caixas de armazenamento dos sachês serão realizados por um pesquisador não envolvido com a pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pelo recrutamento, acompanhamento, coleta e tratamento estatístico dos dados terão acesso apenas à lista contendo os estratos/níveis de randomização e os códigos numéricos. O mesmo código será

usado para identificar a caixa que era entregue ao participante (contendo os sachês com conteúdo do respectivo grupo de estudo que fora alocado). Esta ausência de conhecimento do grupo para o qual o participante será alocado é necessária para garantir a ocultação de alocação.

A ordem de escolha dos códigos será sequencial aos níveis de cada bloco de randomização, isto é, o primeiro paciente do sexo masculino com DM2 em tratamento clínico será alocado para o grupo indicado no bloco do nível 1, correspondente ao estrato “Tratamento clínico - Masculino com DM2” da lista de randomização; o segundo, para o estrato correspondente ao sexo masculino com DM2 do nível 2 desta lista, e assim por diante. Para cada um dos três grupos de pacientes (clínico, cirúrgico e agudo), haverá ao final do estudo: 56 indivíduos no grupo intervenção (probiótico), sendo 14 homens com DM2, 14 homens sem DM2, 14 mulheres com DM2 e 14 mulheres sem DM2, e o mesmo quantitativo no grupo controle (placebo).

Ao final da participação do indivíduo no estudo, os pesquisadores irão questionar sobre qual suplemento o participante acreditava estar consumindo (probiótico ou placebo) e o porquê, visando certificar a eficácia do cegamento.

5.3.3 Caracterização da intervenção

O suplemento probiótico, referente à intervenção desta pesquisa, apresenta a seguinte composição e informação nutricional:

Quadro 1 - Informação da composição do suplemento.

Porção de 1 g - 1 sachê	
Composição	Quantidade (UFC/dia)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1×10^9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1×10^9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10^9
<i>Bifidobacterium lactis</i>	1×10^9

Legenda: UFC – Unidades Formadoras de Colônia.

Os indivíduos serão orientados a consumir um sachê por dia (4×10^9 UFC/dia) durante 90 dias antes de uma grande refeição. Cada sachê deverá ser diluído em 100 mL de água em temperatura ambiente até completa diluição (APÊNDICE G).

O placebo será a maltodextrina, na mesma quantidade do suplemento supracitado (1 grama/dia).

Atualmente, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade (UFSC) recebe doações de suplementos alimentares de diferentes fornecedores para execução de projetos de pesquisa (incluindo pré/pró/simbióticos) e será solicitada nova doação para este projeto, sem conflito de interesse com os pesquisadores.

5.3.4 Desfechos

O desfecho primário será a alteração das concentrações plasmáticas de PCR-us após a suplementação. Os desfechos secundários serão as alterações das concentrações plasmáticas/séricas dos demais indicadores bioquímicos, dos parâmetros clínicos, dos indicadores do estado nutricional e dos sintomas de depressão e ansiedade após a suplementação.

5.3.5 Instrumentos e técnicas de coleta de dados

5.3.5.1 Caracterização dos indivíduos

Os participantes do estudo serão caracterizados quanto a:

- a) Dados pessoais: nome completo, sexo, idade, tabagismo, comorbidades, fármacos utilizados, escolaridade, faixa de renda, cor da pele autodeclarada, endereço residencial, telefone, e-mail e número do prontuário;
- b) Valores basais de todos os desfechos avaliados.

5.3.5.2 Coleta e preparo do material biológico

Um total de 15 mL de sangue será coletado em cada momento do estudo por profissional capacitado de acordo com técnica padronizada (WHO, 2010) na região cubital do antebraço, utilizando tubos apropriados para este fim (sistema Vacutainer® BD Biosciences - Abingdon, UK), em jejum prévio de 8 a 10 horas.

Os tubos de sangue que serão utilizados para as dosagens dos marcadores bioquímicos que não são de rotina no HE, serão centrifugados no Laboratório de Análises Clínicas deste mesmo hospital e alíquotas de 500 µL de plasma serão transferidas para criotubos com capacidade de 2 mL cada, devidamente identificados e armazenados a -80°C.

Importante destacar que as análises serão feitas dentro de um ano após o armazenamento, evitando possíveis perdas de analito por longo período de armazenamento.

Ressalta-se que os exames que fazem parte do protocolo de assistência dos indivíduos assistidos no HE, serão analisados por este hospital, assim, estes dados serão coletados do prontuário do paciente. Para os demais parâmetros laboratoriais, os materiais para coleta de sangue e para a separação e acondicionamento do plasma serão fornecidos pelos pesquisadores, sem ônus ao hospital.

5.3.5.3 Determinação de marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular

Os seguintes marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular serão determinados: Proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us), lipopolissacarídeo, ureia sérica, creatinina sérica, taxa de filtração glomerular, ácido úrico, sódio, potássio, magnésio, cálcio, parcial de urina, enzimas cardíacas, malonaldeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA).

5.3.5.4 Indicadores bioquímicos do estado nutricional

Os seguintes indicadores bioquímicos do estado nutricional serão determinados: Hemograma, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, albumina sérica, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fósforo, ferro sérico, ferritina, transferrina e saturação de transferrina.

5.3.5.5 Avaliação antropométrica do estado nutricional

Para a avaliação antropométrica do estado nutricional serão realizadas aferições de peso, estatura, circunferências corporais, dobras cutâneas e espessura do músculo adutor do polegar (EMAP) por profissionais capacitados, seguindo técnicas adequadas.

O peso será mensurado utilizando uma balança portátil (Marte Científica LS200P[®]), com capacidade de 200 kg e precisão de 50g. Os indivíduos serão pesados com o mínimo de indumentária, descalços, na posição ereta no centro da plataforma da balança e com os braços soltos ao longo do tronco (WHO, 1995).

A estatura será medida por estadiômetro com capacidade de 2,00 m e precisão de 1,0 mm (Altuxata[®]). A estatura dos participantes será aferida com o indivíduo descalço ou com meias finas e usando poucas roupas de modo que o posicionamento do corpo possa ser visto. Os participantes ficarão sobre uma superfície plana, com o peso distribuído uniformemente em ambos os pés em posição ereta, braços pendentes ao lado do corpo, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida. A posição da cabeça será orientada de modo que a linha de visão permaneça perpendicular ao corpo e paralela ao solo (plano de Frankfurt). Os indivíduos serão orientados a inspirar profundamente e manter-se numa posição totalmente ereta. A referência para a mensuração será o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995).

A classificação do estado nutricional será realizada pelo índice de massa corporal (IMC) utilizando-se os pontos de corte definidos pela *World Health Organization* para adultos (WHO, 2008) e por Lipschitz et al. (1994) para idosos. O IMC é definido como uma relação do peso em quilogramas com o valor da estatura em metros ao quadrado (kg/m^2) (WHO, 1995).

A aferição das dobras cutâneas e circunferências será repetida duas vezes e realizada a média das duas aferições, sempre no lado não dominante. Se as aferições diferirem cerca de 1 cm para as circunferências e de 1mm para as dobras cutâneas, será realizada uma terceira medida e a média das três aferições será calculada. Para a aferição das dobras, o paciente deverá estar em pé com o braço paralelo ao tronco e relaxado. Será destacada a dobra formada pela pele e pelo tecido adiposo com os dedos polegar e indicador da mão esquerda a 1 cm do ponto marcado; a dobra será pinçada com o adipômetro (Sanny[®]) exatamente no local marcado (LOHMAN, 1992).

Para a dobra cutânea tricipital (DCT) e bicipital (DCB), o ponto médio do braço será determinado pela medida da distância entre a projeção lateral do processo acromial da escápula e a borda inferior do olecrano da ulna do braço não dominante, com o cotovelo flexionado a 90 graus. A aferição da DCT ocorrerá na área posterior do braço, no músculo tríceps, 1 cm acima do ponto médio marcado. A aferição da DCB ocorrerá na área anterior do braço, no músculo bíceps, 1 cm acima do ponto médio marcado (LOHMAN, 1992). A dobra cutânea subescapular (DCSE) será realizada na diagonal, no ângulo inferior da escápula. A dobra cutânea suprailíaca (DCSI) será aferida na linha axilar anterior, sobre a crista ilíaca, em um ângulo de 45° da horizontal (LOHMAN, 1992). A estimativa do percentual de massa gorda corporal será estimada utilizando-se a somatória da DCT, DCB, DCSE e DCSI,

segundo a equação de Durnin e Womersley (1974). A massa livre de gordura será obtida pela subtração do peso corporal total e do percentual de massa gorda (KAMIMURA et al., 2004).

A circunferência do braço (CB) será efetuada no ponto médio entre a projeção lateral do processo acromial da escápula e a margem inferior da ulna, por uma trena antropométrica inelástica com 2m de comprimento e precisão de 0,1 cm (Sanny[®], Califórnia, EUA), com o braço formando um ângulo de 90 graus. Em seguida, será solicitado ao indivíduo que fique com o braço relaxado, estendido ao longo do corpo, com a palma da mão voltada para a coxa, para a aferição da medida no ponto médio marcado (FRISANCHO, 1974). Para a classificação, será utilizada a tabela de percentis propostos por Frisancho (1981).

A circunferência muscular do braço (CMB) será obtida pela combinação das medidas da DCT e CB, utilizando a seguinte fórmula: $CMB (cm) = CB (cm) - \pi \times (DCT (mm)/10)$ (FRISANCHO, 1981). A área muscular do braço corrigida (AMBc) será calculada utilizando as seguintes fórmulas: $[CB (cm) - \pi \times DCT (mm)]^2 - 10/4\pi$ (homens) e $[CB (cm) - \pi \times DCT (mm)]^2 - 6,5/4\pi$ (mulheres) (FRISANCHO, 1981). Para a classificação de ambas as medidas, será utilizada a tabela de percentis propostos por Frisancho (1981).

Para a medida de circunferência da cintura (CC), a trena será colocada em plano horizontal ao nível do ponto médio entre a costela inferior e a crista ilíaca. O indivíduo será orientado a permanecer em pé, ereto, com os pés juntos, braços estendidos ao lado do corpo e peso uniformemente distribuído, usando o mínimo de indumentária. As medidas serão aferidas no final de uma expiração normal (WHO, 2008). Para a classificação, serão utilizados os pontos de corte propostos por Alberti et al. (2009), de acordo com o sexo e com a etnia.

Para idosos será medida a circunferência da panturrilha (CP), pois é um indicador mais sensível de massa magra nos idosos. Para sua obtenção, o indivíduo pode estar em pé, sentado (com as pernas soltas, sem encostar no chão) ou deitado em posição supina com o joelho flexionado a um ângulo de 90°. Deve-se fazer a medição na parte de maior diâmetro da panturrilha da perna não dominante (CHUMLEA et al., 1988). Valores abaixo de 31 cm serão considerados como indicativos de redução de massa muscular (LANDI et al., 2014).

A medida da EMAP será realizada com o paciente sentado, o braço flexionado à aproximadamente 90° com o antebraço e a mão apoiada sobre o joelho. Os indivíduos serão orientados a ficar com a mão relaxada. Será utilizado o plicômetro para pinçar o músculo adutor no vértice de um triângulo imaginário formado pela extensão do polegar e indicador (LAMEU et al., 2004). O procedimento será feito em ambas as mãos por três vezes sendo usada a média como medida da EMAP. O ponto de corte para classificação foi determinado

segundo preconizado por Andrade, Lameu e Luiz (2005), que apontaram valores acima de 14 mm como preditivo negativo para complicações sépticas, não sépticas e mortalidade.

Para a padronização das medidas antropométricas será adotada a técnica “Erro Técnico de Medição” conforme citado por Perini et al. (2005). Serão recrutados aproximadamente 10 voluntários adultos, utilizando os mesmos equipamentos e seguindo as mesmas técnicas que serão empregadas para a coleta de dados neste estudo.

Uma ferramenta de risco nutricional (NRS-2002) também será aplicada, utilizando um formulário validado. O resultado total da avaliação gera uma classificação baseado no ponto de corte a seguir: ≥ 3 – Com risco nutricional; < 3 – Sem risco nutricional. (KONDRUP et al., 2003).

5.3.5.6 Avaliação da força muscular

A força muscular será avaliada por meio da força de preensão manual (FPM), utilizando um dinamômetro de mão hidráulico (Saehan SH5001[®], Saehan Corporation, Korea). O indivíduo será instruído sobre o uso do dinamômetro, sendo explicado e demonstrado sobre a necessidade de apertar a manopla com sua máxima força. No momento da avaliação, o participante deverá estar sentado, com quadris e joelhos a 90° de flexão, ombro aduzido junto ao tronco, cotovelo flexionado a 90° com o antebraço em posição neutra (entre pronação e supinação) e punho entre 0° e 30° de extensão e 0° a 15° de desvio ulnar (SCHLÜSSEL et al., 2008).

A FPM será avaliada no lado do braço considerado pelo participante como o de maior força, sendo realizadas três medidas, com o período de contração máxima contínua de três segundos. Para a análise será escolhido o maior valor das três aferições. Nas análises, a força de preensão manual será considerada como variável contínua (kg/força). O ponto de corte adotado será o proposto pelo *European Working Group Sarcopenia in Older People* (CRUZ-JENTOFF et al., 2019), de acordo com o sexo (homens: $<27\text{kg/força}$; mulheres: $<16\text{kg/força}$).

5.3.5.7 Quantificação da ingestão alimentar atual

O consumo dietético atual dos indivíduos será estimado por meio da aplicação de três recordatórios de 24 horas (R24h) no momento basal e três R24h no momento final, contemplando dois dias de semana e um dia de final de semana. A aplicação dos R24h será

realizada presencialmente (primeiro recordatório) e por telefone (dois últimos recordatórios). Os indivíduos serão encorajados a relatar, com o máximo de detalhes (tipo, forma de preparo, ingredientes, quantidades em medidas caseiras), todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, em cada refeição. Ao final da entrevista, o pesquisador procederá à revisão dos alimentos e das quantidades relatadas e registradas com o entrevistado (THOMPSON; BYERS, 2004).

Para a análise estimada do quantitativo de energia e nutrientes serão utilizadas a Tabela de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo (TBCA, 2017) e a tabela proposta pela *United States Department of Agriculture* (USDA, 2019). Na ausência dos itens alimentares nas tabelas de base de dados citadas, proceder-se-á a elaboração de fichas técnicas de preparações ou consulta em rótulos de embalagens para determinação dos valores de energia e nutrientes.

Ainda, para maior fidedignidade do consumo relatado, serão elaboradas fichas técnicas de preparações para as preparações alimentares que estão disponíveis nas bases de dados consultadas, mas que não consideram em sua descrição o uso de açúcar, sal ou óleo de adição. As quantidades destes ingredientes adicionadas às fichas técnicas serão calculadas de acordo com grupo alimentar e técnica de preparo e com base nas recomendações preconizadas na literatura (DOMENE, 2014). Posteriormente, as medidas caseiras serão padronizadas e transformadas em gramas/mililitros de alimentos/bebidas, tendo como referência os valores disponíveis nas tabelas de equivalências de Pinheiro et al. (2002) e Fisberg et al. (2002).

Serão calculadas as médias de consumo de energia e nutrientes, em seguida, será realizado o ajuste para a variabilidade intra e interindividual utilizando a estimativa das médias quadráticas. Para obter esses componentes é necessário utilizar a análise de variância (ANOVA). A partir destes dados pode-se calcular a variância total e, posteriormente, a média e o desvio padrão ajustados (IOM, 2001).

Posteriormente ao ajuste para variabilidade intra e interindividual, será realizado ajuste para calorias pelo método dos resíduos a fim de corrigir as estimativas de nutrientes pela ingestão de energia total, conforme metodologia descrita por Willett, Howe e Kushi (1997).

Após a conclusão da entrada de dados dos relatos de consumo para cada momento do estudo, será realizada uma análise para avaliar a consistência das informações digitadas e a presença de valores extremos de ingestão diária (<500 ou >4000 kcal). Essa etapa permitirá verificar possíveis erros de digitação ou a ocorrência de sub ou super-relatos da ingestão diária relatada pelos indivíduos. Os indivíduos com sub ou super-relato serão desconsiderados

da análise final.

5.3.5.8 Parâmetros clínicos

Parâmetros clínicos como pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca, presença e duração de comorbidades, fármacos utilizados, alterações gastrointestinais, consistência e formato das fezes, hábito tabágico, eventos cardiovasculares adversos maiores, infecções, mortalidade, história de eventos cardiovasculares e escore de risco cardiovascular serão verificados. Para a determinação da presença de constipação serão utilizados os critérios diagnósticos do ROMA IV (LACY et al., 2016), um sistema internacional desenvolvido para classificar desordens gastrointestinais funcionais. Para a determinação da consistência e do formato das fezes serão utilizados os critérios da Escala Fecal de Bristol (LEWIS; HEATON, 1997), a qual classifica a forma e a consistência das fezes humanas em sete categorias, sendo a categoria número 4 como a referência ideal.

5.3.5.9 Avaliação de sintomas de depressão

Para avaliação dos sintomas de depressão será utilizado o Inventário de Depressão de Beck (BDI) (BECK et al., 1961; GOMES-OLIVEIRA et al., 2012). Uma escala que consiste de 21 itens, incluindo sintomas e atitudes, cuja intensidade varia de 0 a 3. Os itens referem-se à tristeza, pessimismo, sensação de fracasso, falta de satisfação, sensação de culpa, sensação de punição, autodepreciação, autoacusações, ideias suicidas, crises de choro, irritabilidade, retração social, indecisão, distorção da imagem corporal, inibição para o trabalho, distúrbio do sono, fadiga, perda de apetite, perda de peso, preocupação somática, diminuição de libido. A pontuação do estado de humor será calculada como a soma das pontuações dos sintomas mencionados acima. Escores abaixo de 15, 15-19, 20-29 e 30-63 serão considerados como depressão normal, leve, moderada e grave, respectivamente (GORENSTEIN; ANDRADE, 1998). O questionário será aplicado verbal e individualmente por pesquisadores treinados.

5.3.5.10 Avaliação de sintomas de ansiedade

Para avaliação dos sintomas de ansiedade será utilizado o Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE) que apresenta duas escalas que avaliam a ansiedade enquanto estado (IDATE-E) ou traço (IDATE-T) (BIAGGIO, 1979; SPIELBERGER; GORSUCH;

LUSHENE, 1970). O IDATE é um dos instrumentos mais utilizados para quantificar componentes subjetivos relacionados à ansiedade que apresenta uma escala que avalia a ansiedade enquanto estado (IDATE-E) e outra que acessa a ansiedade enquanto traço (IDATE-T). Enquanto o estado de ansiedade reflete uma reação transitória diretamente relacionada a uma situação de adversidade que se apresenta em dado momento, o traço de ansiedade refere-se a um aspecto mais estável relacionado à propensão do indivíduo lidar com maior ou menor ansiedade ao longo de sua vida. De acordo com este inventário, a escala estado requer que o participante descreva como se sente “agora, neste momento” em relação a 20 itens apresentados em uma escala de 4 pontos: 1- absolutamente não; 2- um pouco; 3- bastante; 4- muitíssimo. De maneira semelhante, a escala traço também é composta de 20 itens, mas o participante recebe a instrução de que deve responder como “geralmente se sente”, de acordo com uma nova escala de 4 pontos: 1- quase nunca; 2- às vezes; 3- frequentemente; 4- quase sempre. A pontuação do estado de ansiedade será calculada como a soma das pontuações dos sintomas mencionados acima, sendo que os valores mais altos indicam maiores níveis de ansiedade. O questionário será aplicado individualmente por pesquisadores treinados.

5.3.5.11 Avaliação indireta da atividade física

O instrumento utilizado para avaliação indireta da atividade física será o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) em sua versão longa, traduzido e validado para o Brasil (MATSUDO et al., 2001), o qual permite estimar o tempo semanal gasto em atividades físicas de intensidade moderada e vigorosa e caminhada, nos diferentes domínios do cotidiano, como: trabalho, transporte, atividades domésticas e de lazer e ainda o tempo sentado durante um dia de semana e um dia de final de semana. Sua versão longa é constituída por 27 questões, referente a atividades realizadas por pelo menos 10 minutos contínuos, em uma semana habitual ou referente à última semana (ANEXO C).

A partir destes dados, será verificado o equivalente metabólico (MET) em horas para cada uma das atividades, permitindo realizar uma estimativa do gasto energético semanal. Um MET equivale à energia suficiente para um indivíduo se manter em repouso, representado na literatura pelo consumo de oxigênio (VO_2) de aproximadamente 3,5 mL/kg/min (AINSWORTH et al., 2000). Embora essa constante possa ser válida para um homem de 70 kg e 40 anos de idade, ela é superestimada em homens e mulheres com peso elevado

(BYRNE et al., 2005). Para corrigir os valores de MET nesta situação, serão utilizados fatores de correção de acordo com a faixa de IMC e sexo do participante (WILMS et al., 2014):

Tabela 2 - Fatores de correção para o cálculo do equivalente metabólico (MET) em indivíduos com peso elevado.

Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	Fatores de correção (mL kg ⁻¹ min ⁻¹)	
	Homens	Mulheres
25,0-29,9	-	-0,66
30,0-34,9	-0,54	-0,82
35,0-39,9	-0,79	-0,96
40,0-44,9	-0,91	-1,04
45,0-49,9	-0,97	-1,14
50,0-54,9	-1,01	-1,21
55,0-59,9	-1,14	-1,27
> 60,0	-1,14	-1,36

Fonte: adaptado de Wilms et al. (2014).

Para determinar o MET semanal de cada paciente, será multiplicado o número de horas por dia relatado para cada atividade física pelos respectivos coeficientes do MET, obtidos a partir de tabelas padronizadas (AINSWORTH et al., 2000). Em seguida, o valor final do MET diário de cada paciente será corrigido, considerando os fatores de correção descritos acima. Por fim, o valor diário será multiplicado por sete para se obter o MET semanal.

5.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os indivíduos convidados a participar do estudo receberão todas as explicações necessárias para o entendimento do protocolo experimental, assim como dos riscos e possíveis benefícios. Se concordar em participar, será feita a leitura do Termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) e sanadas dúvidas, se existirem. Em seguida, o TCLE será assinado pelo participante.

Destaca-se que nenhum indivíduo será obrigado a participar do estudo, assim como, poderá se retirar do estudo a qualquer momento. Além disso, todas as informações coletadas serão sigilosas, mas estarão disponíveis para o participante, caso haja interesse do mesmo. Os formulários preenchidos com as informações coletadas dos participantes ficarão de posse do coordenador deste estudo, Prof. Dr. Ricardo Fernandes, armazenados em arquivo pessoal, localizado no Gabinete 7, na Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

O protocolo deste estudo segue os preceitos estabelecidos na declaração de Helsinki

e na Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 2012 (BRASIL, 2013).

5.5 RISCOS

No que concerne à segurança do consumo de probióticos, Hempel et al. (2011) reuniram estudos experimentais que avaliaram a segurança da suplementação de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e outras espécies bacterianas, com o objetivo de reduzir, prevenir ou tratar doenças (n=41.189). Após compilação dos resultados de todas as investigações avaliadas, Hempel et al. (2011) verificaram que o risco relativo para ocorrência de eventos adversos após a suplementação de *Lactobacillus spp.* foi de 0,98 (95% CI: 0,87-1,11, p=0,785) e após a suplementação de *Bifidobacterium spp.* foi de 0,90 (95% CI: 0,00-1,10, p=0,302) quando comparados com indivíduos sem doenças.

Conforme duas revisões sistemáticas da literatura (BESERRA et al., 2015; FERNANDES et al., 2017) sobre os efeitos de prebióticos e simbióticos em parâmetros metabólicos e inflamatórios em indivíduos com sobrepeso ou obesidade (com a participação do coordenador desta presente proposta), não houve desistência dos participantes nos estudos com simbióticos, independentemente da dose de probióticos contidos nos simbióticos ($2,7 \times 10^8$ a 12×10^9 UFC/dia) ou do tempo de suplementação (30 a 196 dias). Importante mencionar que simbióticos são produtos alimentares que contém prebióticos e probióticos. Os efeitos adversos relatados (dor abdominal devido à flatulência excessiva, na maioria dos casos) eram de baixa intensidade e apenas nos primeiros dias de suplementação, indicando que em alguns indivíduos pode haver um período de adaptação. Como o nosso estudo pretende utilizar uma dose de 4×10^9 UFC/dia durante 90 dias, espera-se que não haja reações adversas ou que sejam de baixa intensidade, sem acarretar a desistência dos participantes.

O maior risco que o protocolo experimental possa oferecer ao participante está atrelado ao acesso venoso para coleta de material biológico para a obtenção dos desfechos bioquímicos. No entanto, destaca-se que para a coleta de sangue, será utilizado material estéril e descartável, evitando a transmissão de contaminantes químicos e biológicos, além de ser feito por profissional capacitado.

5.6 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados serão organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010[®]. A análise estatística será realizada no programa estatístico STATA[®] versão 13.1 para Windows[®].

As variáveis contínuas serão sintetizadas em duas únicas medidas por grupo: média e desvio padrão se a distribuição for simétrica, ou mediana e intervalo interquartil se for assimétrica. Em contrapartida, as variáveis categóricas serão descritas em categorias e frequência a partir do aparecimento nos grupos estabelecidos. Para avaliação da distribuição dos dados será aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk; se o resultado for $<0,05$, rejeita-se a normalidade dos dados. Neste caso, os dados passarão por normalização logarítmica ou serão utilizados testes não-paramétricos.

Para variáveis contínuas, as comparações entre os grupos (controle e suplementado) serão realizadas utilizando o teste T de student (caso os dados apresentem distribuição normal) ou o Teste de Mann-Whitney (caso os dados não apresentem distribuição normal). Para comparações intra-grupo será aplicado o teste de T pareado ou teste da soma dos postos de Wilcoxon, quando as variáveis forem simétricas e não-simétricas, respectivamente, com aplicação do teste *post-hoc* apropriados de acordo com a normalidade dos dados.

Para variáveis categóricas, as comparações entre os grupos (controle e suplementado) serão realizadas utilizando o Teste de Qui-Quadrado (ou teste de Fisher quando o valor esperado em uma casela for menor que 5).

Para a análise de correlações serão utilizadas as correlações de Pearson ou Spearman de acordo com a normalidade das variáveis.

O valor basal de cada desfecho e a variação média de IMC, circunferência da cintura, do MET semanal e de ingestão de energia e fibras dietéticas serão testadas para inclusão como covariáveis em modelos de regressão linear múltipla para os desfechos contínuos da pesquisa. Caso haja dados não paramétricos, estes passarão por normalização logarítmica para serem incluídos nos modelos.

Para todos os testes, será adotado o nível de significância de 95% ($p<0,05$).

6 PRODUTOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS

O plano de trabalho proposto é um projeto temático que visa à avaliação da contribuição de probióticos na modulação de variáveis bioquímicas, clínicas, antropométricas e de saúde mental que estão relacionadas a fatores prognósticos em indivíduos com DCV.

Este projeto prevê como produtos científicos a elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da UFGD, trabalhos de conclusão de curso e de iniciação científica dos cursos de Nutrição e Medicina da UFGD, assim como a elaboração de artigos originais e de revisão a serem submetidos a periódicos com qualis B1 ou superior - considerando os critérios para a área de Nutrição na Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Com relação aos resultados, destaca-se que cada vez mais os probióticos fazem parte do consumo alimentar da população brasileira, seja por meio de alimentos e de bebidas (iogurtes, queijos, leite fermentado, kombucha, entre outros), seja por meio de suplementação oral. Os indivíduos com DCV apresentam maior expectativa com o consumo de ingredientes alimentares que possam contribuir para a melhora de parâmetros antropométricos (perda de peso e de gordura corporal e/ou ganho de massa muscular), bioquímicos (melhora do perfil lipídico, glicêmico e imunológico), clínicos e do estilo de vida (maior tolerância gastrointestinal a farmacoterapia, melhor aceitação na mudança de hábitos dietéticos, menor número de eventos relacionados à dor, entre outros). Apesar disso, as evidências científicas são limitadas sobre o efeito do consumo de probióticos em indivíduos com DCV. Todavia, revisões sistemáticas com meta-análise têm mostrado que o consumo de probióticos em situações de doença correlatas (obesidade, dislipidemia, DM2) traz impacto significativo em desfechos bioquímicos, antropométricos e clínicos.

Dessa forma, iniciativas que tenham por objetivo modular a microbiota intestinal e, por conseguinte, parâmetros bioquímicos, antropométricos, clínicos e de saúde mental de indivíduos com DCV, podem contribuir para um prognóstico mais favorável e proporcionar maior qualidade de vida. Pretende-se, ainda, agregar novos conhecimentos e fortalecer as bases científicas para estudos futuros quanto ao efeito da suplementação de probióticos em indivíduos com DCV.

O estudo pretende preencher uma lacuna teórica identificada por meio de busca realizada em bases de dados, por meio da qual há número limitado de estudos com desenho metodológico semelhante ao apresentado e que forneçam informações sobre o efeito da suplementação de probióticos nas situações de doença a serem investigadas.

Ainda pretende-se verificar se a dose e tempo de suplementação apresentarão benefícios quanto os desfechos analisados, podendo inferir esse valor como dose nutricional complementar e adjuvante na terapêutica global de doenças cardiovasculares.

Quanto à formação de recursos humanos, o projeto contribuirá para a formação de estudantes (mestrado, graduação), bem como o aprimoramento de docentes dos cursos de graduação e pós-graduação em Nutrição da UFGD e UFSC.

No presente momento, há uma parceria em andamento com o Prof. Dr. Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade e com seu grupo de pesquisa vinculado ao departamento de Nutrição da UFSC. O Prof. Dr. Erasmo Trindade tem larga experiência em pesquisas na área da microbiota intestinal e contribuirá, juntamente com seu grupo, na produção coletiva de artigos científicos, sejam originais ou revisões sistemáticas com meta-análise. Ademais, haverá intercâmbio de conhecimento entre docentes, pós-graduandos e graduandos, além da possibilidade de visitas institucionais.

7 ESTRATÉGIAS DE DIFUSÃO DOS CONHECIMENTOS GERADOS

Está prevista a publicação dos resultados desta pesquisa em formato de artigos científicos, apresentações orais e de resumos em eventos científicos locais, nacionais e/ou internacionais nas áreas de Nutrição, Cardiologia, Endocrinologia e Gastroenterologia, assim como o contato com meios de comunicação local e nacional para que os resultados da pesquisa fiquem acessíveis para a comunidade científica e para a população em geral.

8 REFERÊNCIAS

AINSWORTH, B. E. et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, p. 498–516, 2000.

ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.

ANDRADE, F. N.; LAMEU, E. B.; LUIZ R. R. Musculatura adutora do polegar: um novo índice de prognóstico em cirurgia cardíaca valvar. **Revista da SOCERJ**, v. 18, n. 5, p. 384-391, 2005.

ASEMI, Z. et al. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, n. 1-2, p. 1-9, 2013.

BECK, A. T. et al. An inventory for measuring depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 4, p. 561–571, jun. 1961.

BERNINI, L. J. et al. Beneficial effects of Bifidobacterium lactis on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p.716-719, 2016.

BESERRA, B. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 845-858, 2015.

BIAGGIO, A.M.B., N., L. **Manual para Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE)**. Rio de Janeiro: Centro Editor de Psicologia Aplicada (CEPA), 1979.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. SAÚDE, C. N. D. Brasília: **Diário Oficial da União**. 2013.

BOTTACINI, F. et al. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 13, S4, 2014. Suplemento 1.

BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1: 42, 2016.

BOUTAGY, N. E. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? **Biochimie**, v. 124, p. 11-20, 2016.

BYRNE, N. M. et al. Metabolic equivalent: one size does not fit all. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 1112–1119, 2005.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p.1761–1772, 2007.

CANI, P. D.; JORDAN, B.F. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 11, p. 671-682, 2018.

CAVALCANTI NETO, M. P. et al. Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? **Pharmacological Research**, v. 130, p. 152-163, 2018.

CHROUSOS, G. P. Stress and sex versus immunity and inflammation. **Science Signaling**, v. 3, n. 143, p. 36, 2010.

CHUMLEA, W.C.; GUO, S.; ROCHE, A.F. et al. Prediction of body weight for the nonambulatory elderly from anthropometry. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 88, p. 564-568. 1988.

COSTANZA, A. C. et al. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. **International Journal of Cardiology**, v. 179, p. 348-50, 2015.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. **Age Ageing**, v. 48, n. 1, p. 16-31, 2019.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, 2014.

DICERBO, A. et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 3, p. 187-203, 2016.

DIETRICH, C. G.; KOTTMANN, T.; ALAVI, M. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 42, p. 15837-15844, 2014.

DOMENE, S. M. A. **Técnica Dietética: teoria e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014.

DURNIN, J. V.; WOMERSLEY, J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 77-97, jul. 1974.

FERNANDES, R.; et al. Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 1197-1206, 2017.

FISBERG, R. M., VILLAR, B. S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares**. São Paulo: Signus, 2002.

FORSLUND, K et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. **Nature**, v. 528, n. 7581, p. 262-266, 2015.

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 11, p. 2540-2545, 1981.

FRISANCHO, A. R. Triceps skin fold and upper arm muscle size norms for assessment of nutritional status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, n. 10, p. 1052-1058, 1974.

FUENTES, M. C. et al. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1866-1872, 2013.

GOMES-OLIVEIRA, M. H. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 4, p. 389–394, dez. 2012.

GORENSTEIN, C.; ANDRADE, L. H. S. G. DE. Inventario de depressao de Beck: propriedades psicometricas da versao em portugues. **Revista de Psiquiatria Clínica (São Paulo)**, v. 25, n. 5, p. 245–50, 1998.

GUARNER, F. et al. **World Gastroenterology Organisation global guidelines: probiotics and prebiotics February 2017**. Disponível em:
<<http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>>. Acesso em: 01 fev 2019.

HEMPEL, S. et al. **Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease**. Rockville, 2011. 645 p. (200).

HENDIJANI, F.; AKBARI, V. Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 532-541, 2018.

HIGASHIKAWA, F. et al. Antiobesity effect of *Pediococcus pentosaceus* LP28 on overweight subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 582-587, 2010.

HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-14, 2014.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177-185, 2017.

IEMOLI, E. et al. Probiotics reduce gut microbial translocation and improve adult atopic dermatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, S33-40, 2012. Suplemento.

IOM. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference intake: application in Dietary Assessment**. Washington (DC): National Academic Press; 2001. 285p.

KAMIMURA, M. A., et al. Métodos de avaliação da composição corporal em pacientes submetidos à hemodiálise. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 97-105, jan./mar. 2004.

KONDRUP, J., et al. Educational and Clinical Practice Committee, European Society of Parenteral and Enteral Nutrition (ESPEN). ESPEN guidelines for nutrition screening 2002. **Clinical Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 415-421, aug. 2003a.

LACY, B.E. et al. Bowel disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1393-1407, 2016.

LAMEU, E. B. et al. Adductor pollicis muscle: a new anthropometric parameter. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 2, p. 57-62, 2004.

LANDI, F. et al. Calf circumference, frailty and physical performance among older adults living in the community. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 539-544, 2014

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541-546, 2013.

LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. 9, p. 920–924, 1997.

LIANG, S.; WU, X.; JIN, F. Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 12:33, 2018.

LOHMAN, T.G. **Advances in body composition assessment**. Current issues in exercise science series. Monograph n.3. In: Champaign IL. Human Kinetics, 1992.

LIPSCHITZ, D. A. Screening for nutritional status in the elderly. **Primary Care**, v. 21, n. 1 p. 55-67, 1994.

ODAMAKI, T. et al. Effect of the oral intake of yogurt containing Bifidobacterium longum BB536 on the cell numbers of enterotoxigenic Bacteroides fragilis in microbiota. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 14-18, 2012.

PERINI, T. A. et al. Cálculo do erro técnico de medição em antropometria. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 1, p. 81-85, Jan./Fev. 2005.

PINHEIRO, A.B.V. et al. **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 75p.

PIRBAGLOU, M. et al. Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. **Nutrition Research**, v. 36, n. 9., p. 889-898, 2016.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

QIN, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55-60, 2012.

RAYGAN, F.; OSTADMOHAMMADI, V.; ASEMI, Z. The effects of probiotic and selenium co-supplementation on mental health parameters and metabolic profiles in type 2 diabetic patients with coronary heart disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, 2018. no prelo.

SCHLÜSSEL, M. M. et al. Reference values of handgrip dynamometry of healthy adults: A population-based study. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 601-607, 2008.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do Impacto Econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

SPIELBERGER, C. D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R. D. **The State-Trait Anxiety Inventory (STAI)**. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press., 1970.

SUN, J.; BUYS, N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Annals of Medicine**, v. 47, n. 6, p. 430-440, 2015.

SURESH, K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8-11, 2011.

TBCA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 6.0. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tbca/>>. Acesso em 01 fev 2019.

THOMPSON, F. E.; BYERS, T. Dietary assessment resource manual. **Journal of Nutrition**. v. 124, n. 11, p. 2245S-2317S, 1994. Suplemento.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient Database for standard Reference**. 2019. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/>>. Acesso em 01 fev 2019.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. W. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 1220S-1228S, 1997. Suplemento.

WILMS, B. et al. Correction factors for the calculation of metabolic equivalents (MET) in overweight to extremely obese subjects. **International Journal of Obesity (London)**, v. 38, n. 11, p. 1383-1387, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **BMI classification**, Geneva, Switzerland: WHO, [2008]. Disponível em: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Acesso em: 01 fev. 2019.

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

_____. **WHO Guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy.** 2010.

_____. **Estimated deaths by cause, sex and WHO Member State, 2016.** Disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/>. Acesso em: 01 fev. 2019.

CRONOGRAMA

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja aprovado pelo Sistema CEP/CONEP.

Quadro 2 – Cronograma proposto para elaboração do estudo.

Atividades	Início	Término	Duração
Revisão bibliográfica	Fevereiro/2019	Junho/2022	40 meses
Treinamento e padronização de técnicas	Fevereiro/2019	Julho/2019	5 meses
Coleta de dados*	Agosto/2019	Julho/2021	24 meses
Processamento das amostras	Agosto/2019	Junho/2021	24 meses
Tabulação de dados	Agosto/2019	Junho/2021	24 meses
Análise e discussão dos dados	Agosto/2021	Dezembro/2021	5 meses
Elaboração de produtos científicos	Janeiro/2022	Junho/2022	6 meses
Elaboração de relatório final	Junho/2022	Julho/2022	1 mês

*Previsto. Somente após a aprovação do CEP/CONEP.