



**Evidência experimental de um ingrediente funcional: papel do extrato de levedura
no microbiota intestinal**

**Experimental evidence of a functional ingredient: brewer's yeast extract role
on the gut microbiota**

Catarina Araújo da Costa Teles

Orientação: Cláudia Marques

Tipo de documento: Trabalho de Investigação

Ciclo de estudos: 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição

**Instituição académica: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da
Universidade do Porto**

Porto, 2016

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública, estando associada a várias complicações metabólicas. A levedura da cerveja é um subproduto da indústria alimentar, cujo desperdício causa um grande impacto ambiental, mas com enorme potencial nutricional.

O objetivo deste estudo foi valorizar a levedura de cerveja e investigar o efeito do seu extrato (BY) na prevenção da obesidade, avaliando o seu impacto no microbiota intestinal e metabolismo dos ácidos biliares, uma vez que estes estão intimamente ligados.

Vinte ratos foram tratados durante 12 semanas e divididos em quatro grupos: um com uma dieta standard (St), outro com St+BY, outro com uma dieta rica em gordura (HF) e outro com HF+BY. No final do tratamento, avaliou-se a composição do microbiota intestinal, e a expressão relativa de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo dos ácidos biliares por PCR em tempo real.

O BY diminui a ingestão energética e o ganho de peso de animais alimentados com dieta HF. Para além disso, aumentou o número de *Enterococcus* spp. mas diminui o número de *Bifidobacterium* spp. no microbiota intestinal.

O BY aumentou ainda a expressão relativa da 12- α -hidroxílase (CYP8B1), enzima envolvida na síntese de ácidos biliares.

Assim, de um modo geral, pode dizer-se que o BY parece ter efeitos benéficos no controlo da ingestão alimentar e na excreção de colesterol pelo aumento da síntese de ácidos biliares. Como tal, para demonstrar que o BY poderá ser usado como um ingrediente funcional na prevenção da obesidade e distúrbios metabólicos são necessários mais estudos, não só pré-clínicos como clínicos.

Abstract

Obesity is a public health concern, being associated with several metabolic complications. Brewer's yeast is a byproduct of the brewing process and its waste causes serious environmental problems. However, brewer's yeast has a massive nutritional potential.

The aim of this study was to add value to brewer's yeast and investigate its extract (BY) in the prevention of obesity, evaluating its impact on the gut microbiota and bile acids metabolism, which are intimately connected.

Twenty rats were treated for 12 weeks and divided into four groups: standard diet (St) group, St+BY group, high-fat (HF) diet group and HF+BY group. The gut microbiota composition and the relative expression of liver enzymes involved in bile acids metabolism was evaluated by real-time PCR, at the end of the study.

BY decreased energy intake and weight gain in the animals fed with HF diet. It also increased the number of *Enterococcus* spp. but decreased the number of *Bifidobacterium* spp. in the gut microbiota.

BY increased the relative expression of 12- α -hydroxylase (CYP8B1), an enzyme involved in the bile acids synthesis.

In conclusion, BY seems to have beneficial effects in the control of food intake and in the excretion of cholesterol through the increase of bile acids synthesis. In order to demonstrate that BY can be used as a functional ingredient in the prevention of obesity and metabolic disorders, more studies are necessary, not only pre-clinical but also clinical.

Palavras-Chave

Ácidos biliares; ingrediente funcional; levedura de cerveja; microbiota intestinal; obesidade

Keywords

Bile acids; brewer's yeast; functional ingredient; gut microbiota; obesity

Índice

Resumo	i
Palavras-Chave	iii
Introdução	1
Objetivos	4
Material e Métodos	4
Tratamento dos animais	4
Análise da composição do microbiota intestinal	5
Extração de ARN do fígado e análise de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares por PCR em tempo real	5
Análise estatística	6
Resultados	7
Ingestão alimentar e ganho de peso.....	7
Microbiota intestinal	8
Enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares	9
Discussão e Conclusões	10
Agradecimentos	10
Referências Bibliográficas	16
Anexos	18
Anexo A	19
Anexo B	20
Anexo C	21

Introdução

A obesidade é um crescente problema de saúde pública, a nível mundial, estando associada a várias complicações metabólicas, nomeadamente diabetes, hipertensão arterial, dislipidemias, entre outras ⁽¹⁻⁴⁾. Nos últimos anos, têm aumentado o número de estudos acerca do microbiota intestinal e da sua íntima relação com a obesidade e respetivas complicações metabólicas ⁽⁵⁻⁷⁾.

Como se sabe, o ser humano acolhe dez vezes mais bactérias que o número de células que formam o seu organismo. A composição bacteriana de cada indivíduo é variável, sendo esta definida por fatores genéticos e ambientais, como por exemplo, o modo de nascimento (parto normal ou cesariana), a idade e os hábitos alimentares ⁽⁸⁾. Estima-se que, no microbiota intestinal, existam cerca de mil espécies, distribuídas em 5 *phyla* diferentes. Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% das bactérias pertencem ao *phylum* Firmicutes ou ao *phylum* Bacteroidetes, pertencendo as restantes aos *phyla* Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia ^(8, 9). Sabe-se, ainda, que a composição do microbiota intestinal de indivíduos obesos difere da dos indivíduos normoponderais. Apesar de ainda não existirem certezas de quais as diferenças específicas do microbiota intestinal entre indivíduos obesos e normoponderais, alguns estudos já demonstraram que na obesidade há uma diminuição geral da diversidade microbiana e uma alteração do rácio Firmicutes/Bacteroidetes (aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes) ^(9,10). Estas diferenças têm impacto no metabolismo, nomeadamente na extração de energia de alimentos não digeríveis na parte superior do trato gastro intestinal ⁽¹¹⁾. Isto porque as bactérias existentes vão

condicionar a fermentação de hidratos de carbono não digeríveis e a sua transformação em ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), nomeadamente em acetato, propionato e butirato ⁽⁹⁾. Estes AGCC representam uma importante fonte de energia extra, visto que podem ser absorvidos e utilizados, sobretudo o acetato, como substrato para a lipogénese no fígado, o que poderá favorecer o aumento da adiposidade corporal ⁽⁵⁾.

Nos últimos anos, para além da relevância atribuída ao microbiota intestinal, tem sido reconhecido o papel dos ácidos biliares nas patologias relacionadas com a obesidade, uma vez que estes não estão apenas envolvidos na emulsão e digestão de lípidos e funcionam, também, como moléculas sinalizadoras em diferentes vias metabólicas ⁽¹²⁾.

Os ácidos biliares são esteroides sintetizados no fígado a partir do colesterol. São excretados através da bília no duodeno, havendo sempre uma parte que se perde nas fezes e outra que é reabsorvida no íleo e excretada novamente pelo fígado através do ciclo entero-hepático. O passo limitante da síntese dos ácidos biliares é a reação catalisada pela 7- α -hidroxilase (CYP7A1) (Anexo A), sendo esta enzima estimulada quando os níveis de ácidos biliares baixam ou quando os níveis de colesterol aumentam. ⁽¹²⁾

Os ácidos biliares classificam-se em primários (os que se formam primariamente a partir de colesterol no fígado) e em secundários (os que resultam da transformação dos primeiros pelas bactérias, durante a sua passagem pelo intestino). Os primários são o cólico (CA, sintetizado em maior quantidade) e o quenodesoxicólico (CDCA) que se podem conjugar com resíduos de glicina ou taurina dando origem ao glicocólico e taurocólico e ao glicoquenodesoxicólico e tauroquenodesoxicólico, respetivamente. Os ácidos biliares secundários resultam

da ação das bactérias intestinais que promovem a redução dos grupos hidroxilo e a rotura de ligações com a taurina e a glicina, dando origem aos ácidos desoxicólico (DCA, derivado do CA) e litocólico (LCA, derivado do CDCA). É importante referir que a maioria do LCA se perde nas fezes mas, o DCA é em grande parte reabsorvido ⁽¹²⁾.

Desta maneira, o perfil de ácidos biliares depende da composição do microbiota intestinal, uma vez que, as bactérias intestinais estão envolvidas na sua biotransformação e diferentes comunidades microbianas podem dar origem a diferentes perfis de ácidos biliares. Por outro lado, os ácidos biliares têm, também, a capacidade de modular a composição do microbiota intestinal, uma vez que possuem atividade antimicrobiana, controlando o crescimento bacteriano ⁽¹²⁾.

Uma das principais formas de contrariar a epidemia da obesidade passa pela mudança de estilos de vida e pela adoção de comportamentos mais saudáveis (alimentação equilibrada e prática de exercício físico). No entanto, estas medidas são, muitas vezes, insuficientes e ineficazes. Como tal, nos últimos anos, tem havido uma procura crescente de novas estratégias e de novos fármacos/compostos que ajudem na perda de peso e na melhoria do perfil metabólico destes indivíduos ⁽¹³⁾.

A levedura de cerveja constitui um subproduto da indústria alimentar, cujo desperdício tem um grande impacto ambiental. No entanto, a composição nutricional da levedura de cerveja é bastante interessante, uma vez que é rica em minerais, aminoácidos livres, péptidos bioativos com atividade anti-hipertensiva e, β -glucanos que vários estudos indicam ter efeito prebiótico e efeitos hipocolesterolémicos ^(14, 15).

Objetivos

O objetivo deste estudo foi valorizar um subproduto da indústria alimentar e investigar o seu efeito na prevenção da obesidade, num modelo animal de obesidade induzida pela dieta, avaliando o seu efeito na microbiota intestinal e no metabolismo dos ácidos biliares.

Material e Métodos

Tratamento dos animais

Vinte ratos machos Sprague-Dawley ($367,7 \pm 5,3$ g) foram randomizados e divididos em 4 grupos de 5 animais: grupo “St”, em que os animais foram alimentados com uma ração standard (St); grupo “St+BY”, em que os animais foram alimentados com a mesma ração St mas suplementados com extrato de levedura de cerveja (BY); grupo “HF”, em que os animais foram alimentados com uma dieta rica em gordura (45% das calorias desta ração eram provenientes da gordura) e o grupo “HF+BY”, em que os animais foram alimentados com a mesma dieta rica em gordura mas suplementados com BY. O BY, produzido de acordo com Amorim *et al*⁽¹⁴⁾, foi administrado na água que os animais bebiam na dose de 300 mg/kg peso corporal por dia. Os animais foram submetidos a estas condições durante 12 semanas, monitorizando-se semanalmente o consumo de ração, a ingestão de líquidos, a ingestão energética e o ganho de peso.

No final das 12 semanas os animais foram sacrificados. As fezes foram recolhidas diretamente do cólon e imediatamente congeladas com azoto líquido. As fezes ficaram armazenadas a -20°C até serem analisadas. Para além disso, foram

também recolhidos vários órgãos dos animais durante a ocisão, nomeadamente o fígado.

O protocolo foi aprovado pelo Organismo Responsável pelo Bem Estar Animal da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (ORBEA FMUP).

Análise da composição do microbiota intestinal

O ADN genómico foi extraído e purificado das amostras de fezes usando o *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (nzytech, Lisboa, Portugal) com algumas modificações. O ADN obtido foi quantificado no espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As reações de PCR em tempo real decorreram em microplacas de 96 poços, no aparelho *LightCycler 96*, usando o *kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green* (Roche Applied Science, Indianapolis, ID, EUA). As sequências de *primers* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) usadas para analisar o gene 16S de ARN ribossomal das bactérias e as condições de amplificação usadas estão descritas no Anexo B. As curvas de calibração foram construídas usando várias concentrações de ADN genómico de bactérias puras (Anexo B). Os dados foram analisados usando o *software LightCycler* (Roche Applied Science, Indianapolis, ID, EUA).

Extração de ARN do fígado e análise de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares por PCR em tempo real

Em primeiro lugar, procedeu-se à extração de ARN do fígado dos animais, macerando-se o tecido, previamente congelado, com azoto líquido até que este se convertesse em pó. Após este passo, o ARN foi extraído com o reagente *NZYol* (NZYTech, Lisboa, Portugal). Posteriormente, o ARN foi tratado com

DNase I (Promega, Carnaxide, Portugal). O ARN foi quantificado no espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo FisherScientific, Wilmington, DE, EUA). Após este passo, procedeu-se à síntese de ADN complementar com o *kit* de síntese *NZY First Strand cDNA* (NZYTech, Lisboa, Portugal). As amostras de cADN foram analisadas em duplicado por PCR, como já descrito. Os primers específicos para Rato (Anexo C) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A expressão de genes foi calculada usando o método $2^{-\Delta Ct}$ (16).

Assim, relativamente ao metabolismo dos ácidos biliares, quantificou-se a expressão relativa da redútase do hidroximetilglutaril-CoA (redútase do HMG-CoA, passo limitante na síntese endógena de colesterol), do recetor X ativado pelo farnesóide (FXR, recetor ativado pelos ácidos biliares), da 27-hidroxilase (CYP27A1) e da 12- α -hidroxilase (CYP8B1), enzimas envolvidas na síntese de ácidos biliares (Anexo A).

Análise estatística

Os valores estão expressos como média aritmética $\pm$ erro padrão da média (EP). Para determinar o efeito do tempo e dos diferentes tratamentos, em cada semana, ao longo das doze semanas do estudo, os dados foram analisados com recurso a uma *two-way* ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Para determinar os efeitos da dieta, do BY e da sua interação no microbiota intestinal e na expressão de enzimas hepáticas, os dados foram analisados com recurso a uma *two-way* ANOVA. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas sempre que $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 7 statistical software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

Resultados

Ingestão alimentar e ganho de peso

O consumo de ração foi superior nos animais alimentados com dieta St, comparativamente aos animais alimentados com dieta HF ($p < 0,05$; Figura 1A). Quando se compara a média da ingestão alimentar no total das 12 semanas, verifica-se uma ligeira diminuição do consumo de ração no grupo HF+BY relativamente ao grupo HF.

Relativamente à ingestão energética, verificou-se que, nos grupos alimentados com dieta HF, a ingestão energética foi superior aos grupos St ($p < 0,05$). Verificou-se ainda, quando se comparou o grupo HF+BY com o grupo HF, que a ingestão energética do grupo HF foi superior (Figura 1B).

Quanto à ingestão de líquidos, verificou-se que a ingestão foi superior nos grupos tratados com BY (Figura 1C).

Em relação ao ganho de peso, os grupos alimentados com dieta HF tiveram um maior ganho de peso ($p < 0,05$) comparativamente com os grupos St. Pode ainda verificar-se, que o grupo HF+BY teve um menor ganho de peso que o grupo alimentado apenas com dieta HF, a partir da décima semana (Figura 1D).

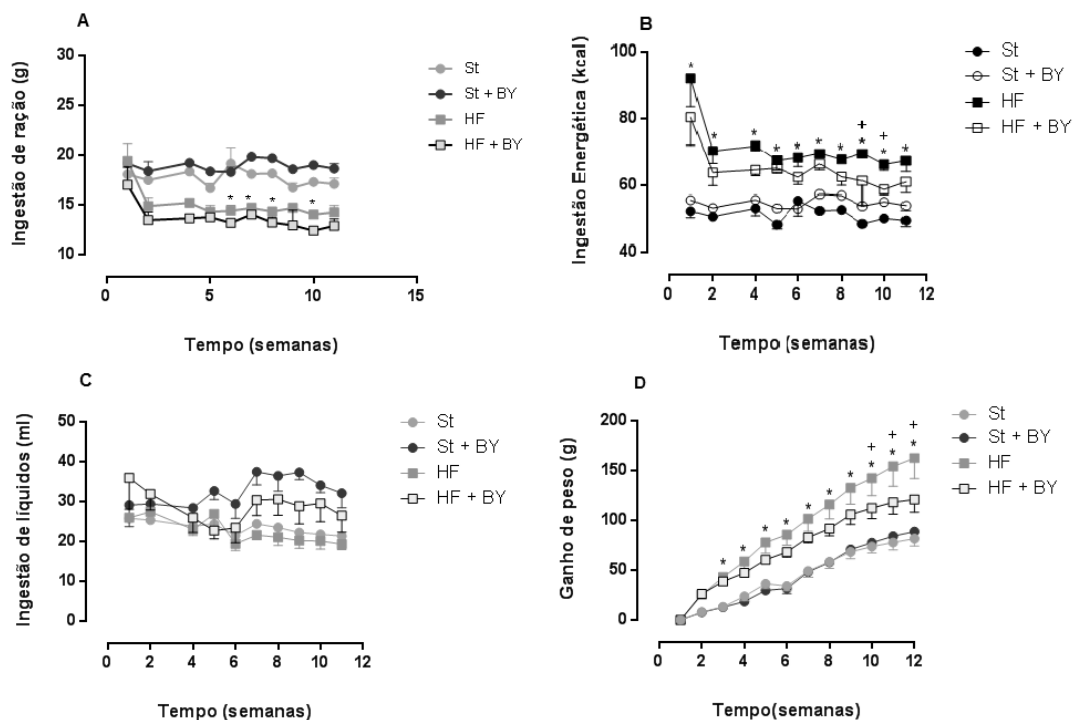


Figura 1. Ingestão de ração (A), ingestão energética (B), ingestão de líquidos (C) e ganho de peso (D) dos animais dos diferentes grupos tratados durante 12 semanas. St: grupo alimentado com uma dieta *standard*; St+BY: grupo tratado com dieta *standard* e suplementado com extrato de levedura; HF: grupo alimentado com dieta rica em gordura; HF+BY: grupo alimentado com dieta rica em gordura e suplementado com extrato de levedura. Resultados expressos em média $\pm$ EP (n=5). * $p < 0,05$ entre os grupos St e HF; + $p < 0,05$ entre os grupos HF e HF+BY.

Microbiota intestinal

Relativamente ao microbiota intestinal, pode verificar-se que quando se analisa o efeito da dieta, isto é, quando se compara dieta HF com dieta St, houve uma diminuição geral das bactérias intestinais, havendo uma diminuição dos Firmicutes, Bacteroidetes e *Lactobacillus* spp. e um ligeiro aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes (Tabela 1).

Quando se analisa o efeito do BY, verificou-se que, nos animais tratados com BY, houve um aumento dos *Enterococcus* spp., sendo este efeito independente da

dieta ($p_{BY} < 0,001$). Para além disso, observou-se uma diminuição das *Bifidobacterium* spp., verificando-se que esta diminuição foi maior nos animais alimentados com dieta HF (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de *phyla*, géneros e espécies do microbiota intestinal nos diferentes grupos experimentais. Resultados expressos em média $\pm$ EP e expressos como $\log_{10}$ cópias do gene 16S de rARN /20ng de ADN (n=4-5).

					Valores de P Two-way ANOVA		
	St	St + BY	HF	HF + BY	Dieta	BY	Interação
Universal	6.51 $\pm$ 0.06	6.64 $\pm$ 0.05	6.34 $\pm$ 0.04	6.38 $\pm$ 0.05	0.001	0.116	0.378
Firmicutes	6.75 $\pm$ 0.02	6.83 $\pm$ 0.05	6.61 $\pm$ 0.06	6.68 $\pm$ 0.06	0.009	0.160	0.853
Bacteroidetes	5.88 $\pm$ 0.20	6.06 $\pm$ 0.12	5.30 $\pm$ 0.11	5.45 $\pm$ 0.12	0.001	0.281	0.887
Firmicutes/Bacteroidetes	1.15 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.03	1.23 $\pm$ 0.03	0.010	0.511	0.945
Lactobacillus spp.	5.34 $\pm$ 0.10	5.18 $\pm$ 0.16	2.66 $\pm$ 0.43	2.16 $\pm$ 0.03	<0.001	0.129	0.416
Enterococcus spp.	3.05 $\pm$ 0.07	4.26 $\pm$ 0.18	3.15 $\pm$ 0.10	4.11 $\pm$ 0.21	0.874	<0.001	0.451
Clostridium leptum	5.62 $\pm$ 0.09	5.55 $\pm$ 0.05	5.52 $\pm$ 0.16	5.77 $\pm$ 0.09	0.552	0.356	0.126
Bacteroides spp.	3.66 $\pm$ 0.56	3.91 $\pm$ 0.19	3.73 $\pm$ 0.15	3.99 $\pm$ 0.16	0.830	0.461	0.983
Prevotella spp.	3.18 $\pm$ 0.40	3.70 $\pm$ 0.40	2.47 $\pm$ 0.26	2.61 $\pm$ 0.05	0.013	0.318	0.574
Bifidobacterium spp.	3.85 $\pm$ 0.35	3.68 $\pm$ 0.16	4.02 $\pm$ 0.28	2.65 $\pm$ 0.30 †	0.147	0.015	0.050

Enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares

A expressão relativa da redútase do HMG-CoA estava diminuída nos grupos alimentados com dieta HF comparativamente com os grupos St ($p < 0,05$; Figura 2A).

Quanto à expressão relativa do FXR, não se verificaram diferenças entre os grupos (Figura 2B).

Em relação à CYP27A1, verificou-se um aumento nos grupos HF comparativamente aos grupos St ($p < 0,05$; Figura 2C).

Por fim, observou-se um aumento da expressão relativa da CYP8B1 nos grupos HF ($p < 0,05$) relativamente aos grupos St. Podendo ainda se verificar uma interação do BY com a dieta St ($p < 0,05$) (Figura 2D).

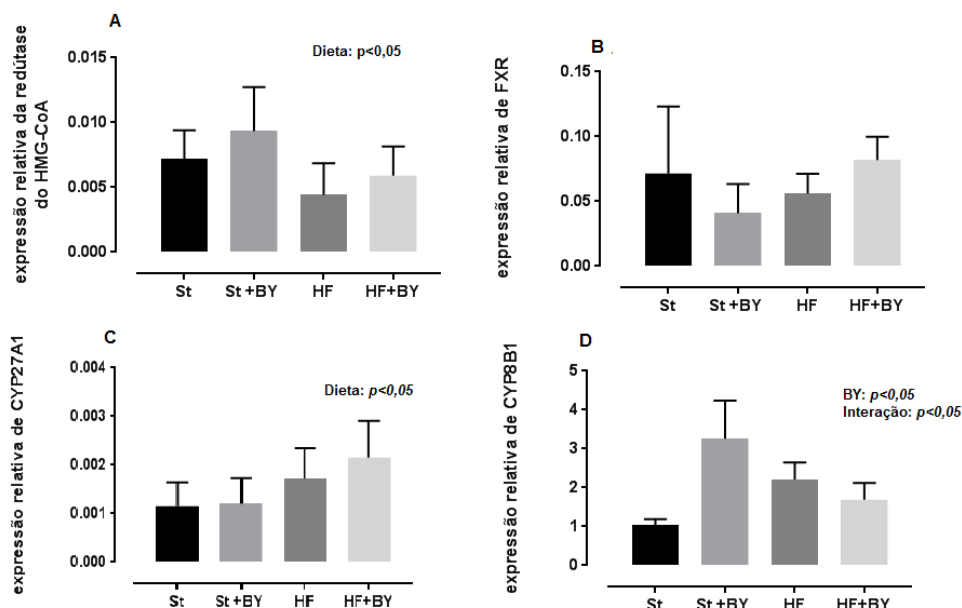


Figura 2. Expressão relativa da redutase do HMG-CoA (A), expressão relativa de FXR (B), expressão relativa de CYP27A1 (C), expressão relativa de CYP8B1 (D).

St: grupo alimentado com uma dieta *standard*; St+BY: grupo tratado com dieta *standard* e suplementado com extrato de levedura; HF: grupo alimentado com dieta rica em gordura; HF+BY: grupo alimentado com dieta rica em gordura e suplementado com extrato de levedura. Resultados expressos em média $\pm$ EP (n= 3-5).

Discussão e Conclusões

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do BY na prevenção da obesidade, num modelo animal de obesidade induzida pela dieta.

Neste modelo, os grupos HF, apesar de terem ingerido menos ração, consumiram mais energia, dado que a ração ingerida tinha um maior teor de gordura e, portanto, um valor energético superior ⁽⁶⁾. Para além disso, quando se compararam os grupos alimentados com dieta HF, verificou-se que o grupo que foi suplementado com BY teve uma ingestão energética ligeiramente menor a partir da décima semana. Isto poderá ter acontecido devido ao facto do BY ser rico em fibras (β -glucanos) que levam a um aumento da saciedade e

consequentemente a uma diminuição da ingestão energética ⁽¹⁷⁾. Os animais suplementados com BY apresentaram uma maior ingestão de líquidos. Isto ocorreu, provavelmente, porque o extrato é rico em minerais, como sódio e potássio e, portanto, poderá ter causado mais sede, levando a um aumento do consumo de líquidos ⁽¹⁴⁾. Por fim, verificou-se que os animais alimentados com dieta HF ganharam mais peso, o que seria de esperar, dado que a ingestão energética destes animais foi superior. No entanto, quando se compararam os grupos HF, verificou-se que os que foram suplementados com BY tiveram um menor ganho de peso, podendo isto dever-se ao facto de a partir da décima semana ter havido uma menor ingestão energética por parte dos animais do mesmo grupo. É de referir que, nos ratos tratados com dieta St, não se verificaram diferenças no ganho de peso entre o grupo tratado com BY e o grupo não tratado, sugerindo que este efeito não se verifica no contexto de uma dieta padrão.

Outro dos objetivos do estudo foi perceber qual o impacto da dieta e do BY na microbiota intestinal. A dieta HF provocou uma diminuição geral das bactérias intestinais e um aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes, o que está de acordo com resultados já reportados noutros estudos que relacionam obesidade e microbiota intestinal ^(5, 6, 9). O BY aumentou os *Enterococcus* spp., o que parece ser positivo uma vez que estes parecem exercer efeito probiótico ⁽¹⁸⁾. Por outro lado, ao contrário do que se esperava, visto que o extrato é rico em β -glucanos que apresentam efeito prébiótico, houve uma diminuição das *Bifidobacterium* spp., sendo este efeito ainda maior quando se combina dieta HF mais BY ⁽¹⁵⁾.

Assim, numa perspetiva futura será interessante proceder a mais estudos para se aprofundar o efeito desta interação (dieta HF+BY) na diminuição destas bactérias.

Neste estudo, quantificou-se, ainda, a expressão relativa de várias enzimas hepáticas envolvidas na síntese de ácidos biliares, de modo a compreender o impacto da dieta HF e do BY no metabolismo dos ácidos biliares.

Como era expectável, a redútase do HMG-CoA encontrava-se diminuída nos grupos HF, dado que esta enzima é regulada negativamente pelo colesterol intracelular e estes animais ingeriram uma grande quantidade de colesterol comparativamente com os dos grupos St. Além disso, está descrito que, em modelos animais de obesidade, há um aumento da reabsorção de colesterol a nível intestinal ^(13, 19).

As enzimas envolvidas na síntese dos ácidos biliares, CYP27A1 e CYP8B1, estavam aumentadas nos animais dos grupos HF, o que sugere um aumento da síntese de ácidos biliares, tanto pela via clássica como pela alternativa, e um aumento dos níveis circulantes de ácidos biliares primários, isto é, de CA e de CDCA (que em ratos origina o ácido α -muricólico (α -MCA) e o ácido β -muricólico (β -MCA)) ^(12, 19). Assim, seria expectável que a expressão do FXR estivesse diminuída nestes grupos, visto que, este recetor inibe a síntese de ácidos biliares ^(12, 19). No entanto, não foi possível, verificar esta diminuição possivelmente devido ao tamanho da amostra.

De facto, está já descrito que dietas ricas em gordura aumentam a secreção de ácidos biliares, visto que estes estão envolvidos na sua digestão e absorção ⁽¹²⁾. Assim, já era de esperar que a expressão de enzimas como o CYP27A1 e CYP8B1 estivesse aumentada. Além disso, com o aumento da expressão destas enzimas, prevê-se um aumento de CA que é posteriormente convertido pelas bactérias intestinais em DCA. Este ácido biliar secundário, normalmente aumentado na obesidade, possui atividade antimicrobiana sobre as bactérias

intestinais, estando já descrito um efeito do DCA no aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes ^(12, 19, 20). Em relação à expressão do CYP8B1, é ainda de salientar a interação que se verificou entre o BY e a dieta, isto é, verificou-se que o extrato aumentou a expressão desta enzima mas apenas no contexto de uma dieta padrão. Este aumento é interessante, visto que, quando se fala numa dieta HF existe um aumento da síntese de ácidos biliares devido à elevada ingestão de gordura, nomeadamente de colesterol, e um aumento da sua reabsorção a nível intestinal. Assim sendo, a síntese de ácidos biliares no contexto de uma dieta HF parece ser um mecanismo de compensação para excretar o excesso de colesterol exógeno. No entanto, quando se fala numa dieta padrão, em que não existe uma elevada ingestão de gordura, inclusive de colesterol, o aumento da síntese de ácidos biliares parece ser uma interessante maneira de diminuir os níveis de colesterol endógeno, diminuindo os níveis totais de colesterol ^(12, 19-21).

Deste modo, consegue-se perceber a ligação do padrão alimentar com o microbiota intestinal e metabolismo de ácidos biliares. Isto é, o tipo de alimentação condiciona o perfil de ácidos biliares e estes, por sua vez, modelam a composição das bactérias intestinais. Por outro lado, o microbiota intestinal pode alterar o perfil de ácidos biliares, não só por estar envolvido na sua biotransformação, mas também porque influencia a sua reabsorção a nível intestinal, condicionando a sua circulação entero-hepático. Assim sendo, esta interação parece ser importante do ponto de vista metabólico, nomeadamente a nível do metabolismo de colesterol, já que, o perfil de ácidos biliares secundários vai influenciar a reabsorção do mesmo. Para além disso, o colesterol é ainda

utilizado como substrato na síntese de ácidos biliares, sendo este um mecanismo de catabolismo do mesmo ^(12, 20).

Em resumo, neste estudo avaliou-se o potencial do BY, podendo dizer-se que, no geral, este extrato parece ter efeitos benéficos na prevenção da obesidade. Isto porque se demonstrou que com uma dieta HF, quando se forneceu o BY, para além de uma diminuição da ingestão calórica e ganho de peso, também se verificou um aumento da síntese de ácidos biliares como mecanismo de eliminação de colesterol. Mais ainda, os resultados obtidos neste estudo apontam para um efeito do extrato em mecanismos reguladores do apetite, envolvendo ou não o microbiota. No entanto, não se pode negligenciar o facto de o BY ter diminuído as *Bifidobacterium* spp., uma vez que estas bactérias exercem efeitos positivos na saúde e não existe nenhuma explicação aparente para tal ter acontecido, já que o extrato é rico em β -glucanos com efeito prébiotico. Como tal, será interessante proceder a mais estudos para compreender a causa desta diminuição ^(12, 15, 19, 20).

Assim sendo, será importante a realização de mais estudos, não só em ratos como também em humanos, já que o BY apresenta efeitos interessantes, sendo relevante demonstrar que este subproduto da indústria alimentar poderá, num futuro próximo, ser usado como um ingrediente funcional na prevenção da obesidade e distúrbios metabólicos, reduzindo, portanto, o seu desperdício.

Agradecimentos

À Cláudia Marques, minha orientadora, pelo apoio, disponibilidade e por cada ensinamento.

A todos os investigadores e colaboradores do Departamento de Bioquímica e CINTESIS, por terem facilitado a minha integração no quotidiano do laboratório.

À FCNAUP pelo excelente ensino ao longo destes 4 anos, e por toda a experiência de aprendizagem que me proporcionou.

Ao Departamento de Bioquímica da FMUP por toda a parte laboratorial, e ao Departamento de Química da FCUP por ter colaborado comigo no decorrer do estudo.

Referências Bibliográficas

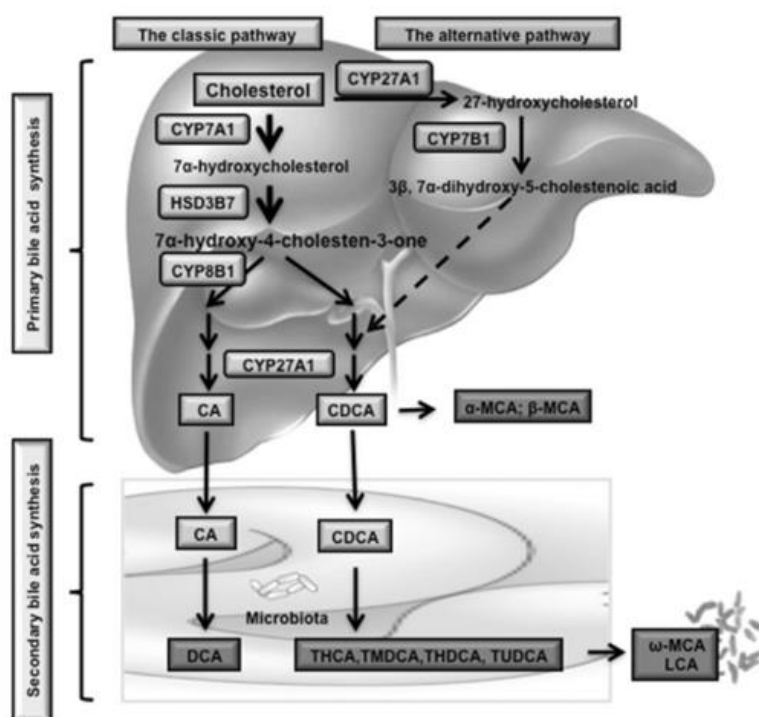
1. Rashid S, Genest J. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. *Obesity* (Silver Spring, Md). 2007; 15(12):2875-88.
2. Jones JL, Sundwall D. Health Care Systems and National Policy: Role of Leadership in the Obesity Crisis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2016; 43(1):19-37.
3. Kolb R, Sutterwala FS, Zhang W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016; 29:77-89.
4. Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Consolim-Colombo FM, Egan BM. Visceral adiposity syndrome [journal article]. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2016; 8(1):1-8.
5. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathologie-biologie*. 2008; 56(5):305-9.
6. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 2016; 5(1):11-21.
7. Woting A, Blaut M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*. 2016; 8(4)
8. Villanueva-Millan MJ, Perez-Matute P, Oteo JA. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *Journal of physiology and biochemistry*. 2015; 71(3):509-25.
9. Arora T, Backhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *Journal of internal medicine*. 2016
10. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity [10.1038/4441022a]. *Nature*. 2006; 444(7122):1022-23.
11. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [10.1038/nature05414]. *Nature*. 2006; 444(7122):1027-131.
12. Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological reviews*. 2014; 66(4):948-83.
13. Jackson VM, Breen DM, Fortin JP, Liou A, Kuzmiski JB, Loomis AK, et al. Latest approaches for the treatment of obesity. *Expert opinion on drug discovery*. 2015; 10(8):825-39.

14. Amorim M, Pereira JO, Gomes D, Pereira CD, Pinheiro H, Pintado M. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. *Journal of Food Engineering*. 2016; 185:42-47.
15. Russo P, López P, Capozzi V, de Palencia PF, Dueñas MT, Spano G, et al. Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13(5):6026.
16. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [10.1038/nprot.2008.73]. *Nat Protocols*. 2008; 3(6):1101-08.
17. Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, Hudson C, Backus R, Richter D, et al. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(1):55-63.
18. Araújo TF, Ferreira CLdLF. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013; 56:457-66.
19. Mencarelli A, Fiorucci S. FXR an emerging therapeutic target for the treatment of atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010; 14(1-2):79-92.
20. Wahlstrom A, Sayin SI, Marschall HU, Backhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell metabolism*. 2016; 24(1):41-50.
21. Graf D, Di Cagno R, Fak F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial ecology in health and disease*. 2015; 26:26164.

Anexos

Anexo A

Síntese de ácidos biliares pela via clássica e alternativa em humanos e ratos.



CA: ácido cólico, CDCA: ácido quenodesoxicólico, DCA: ácido desoxicólico, LCA: ácido litocólico, α -MCA: ácido α -muricólico, β -MCA: ácido β -muricólico, THCA: ácido taurohiocólico, TMDCA: ácido tauomurodesoxicólico, THDCA: ácido taurohiodesoxicólico, TUDCA: ácido tauroursodesoxicólico. CYP7B1: 7 α -hidroxilase do oxisterol, CYP27A1: 27-hidroxilase, CYP7A1: 7 α -hidroxilase do colesterol, CYP8B1: 12 α -hidroxilase.

Anexo B

Sequência dos *primers* e condições de PCR em tempo real usadas para análise do microbiota intestinal

Grupo alvo	Sequência de primers (5'-3')	ADN genômico Standard	Temperatura de annealing
Universal	AAA CTC AAA KGA ATT GAC GG CTC ACR RCA CGA GCT GAC	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	62°C
Firmicutes	ATG TGG TTT AAT TCG AAG CA AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	60°C
Bacteroidetes	CAT GTG GTT TAA TTC GAT GAT AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	60°C
<i>Lactobacillus</i> spp.	GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT C GGC CAG TTA CTA CCT CTA TCC TTC TTC	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	60°C
<i>Enterococcus</i> spp.	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT	<i>Enterococcus gilvus</i> ATCC BAA-350	61°C
<i>Clostridium leptum</i>	GCA CAA GCA GTG GAG T CTT CCT CCG TTT TGT CAA	<i>Clostridium leptum</i> ATCC 29065	60°C
<i>Bacteroides</i> spp.	ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	60°C
<i>Prevotella</i> spp.	CAC RGT AAA CGA TGG ATG CC GGT CGG GTT GCA GAC C	<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	55°C
<i>Bifidobacterium</i> spp.	CGC GTC YGG TGT GAA AG CCC CAC ATC CAG CAT CCA	<i>Bifidobacterium longum subsp.</i> <i>Infantis</i> ATCC 15697	60°C

Anexo C

Sequência dos *primers* e condições de PCR em tempo real usadas para análise da expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Temperatura de annealing°C
CYP8B1	TCCATATGTCCCGGCAGGTTCTTT	66°C
	TGTCAGGGTCCACCAAGTTCAAAGT	
CYP27A1	TTCTTAGTAGGGGTCTTGACAGC	60°C
	TTTAAAGGCAGAGGTGATCCCG	
Redútase da HMG-CoA	CAGCTGTACCATGCCGTCTA	59°C
	CGTGCATTTTCTCCAGGATT	
GAPDDH	GGCATCGTGGAAGGGCTCATGAC	62°C
	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	
FXR	GGCTGCAAAGGTTTCTTCCG	62°C
	TCCCATCTCTCTGCACTTCCT	