

PERFIL PLASMÁTICO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E BIOMARCADORES RELACIONADOS AO GANHO DE PESO EM MULHERES COM DIFERENTES FENÓTIPOS METABÓLICOS E DE ADIPOSIDADE PARTICIPANTES DO *Nutritionist's Health Study*

Palavras-Chave: [obesidade], [ácidos graxos de cadeia curta], [metabolômica]

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 17/10185-9; 19/05450-0; 17/24578; 19/07769

Autores/as:

Marina Gomes Barbosa [Faculdade de Ciências Aplicadas-UNICAMP]

Arthur Noin de Oliveira [Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNICAMP]

Renata Germano Borges de Oliveira Nascimento de Freitas [Faculdade de Saúde Pública-USP]

Isabela Solar [Faculdade de Ciências Aplicadas-UNICAMP]

Francieli Barreiro Ribeiro [Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP]

Rodrigo Ramos Catharino [Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNICAMP]

Dennys Esper Corrêa Cintra [Faculdade de Ciências Aplicadas-UNICAMP]

Bruno Geloneze Neto [Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP]

Sandra Roberta Gouvêa Ferreira [Faculdade de Saúde Pública-USP]

Ana Carolina Junqueira Vasques [Faculdade de Ciências Aplicadas-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O aumento da prevalência de obesidade é alarmante e tem representado um problema mundial de saúde pública. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade são múltiplos e dentre eles estão má alimentação, sedentarismo e a microbiota intestinal juntamente com seus principais metabólitos, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Brown et al., 2016, Hur e Lee, 2015). Os AGCCs são produzidos a partir da fermentação das fibras solúveis da dieta e atuam como fonte de energia pelos enterócitos e, nos tecidos periféricos, modulam sensibilidade à insulina, controle do apetite e adiposidade corporal (Morrison e Preston, 2016). Os principais AGCC são acetato (C2:0), propionato (C3:0), e butirato (C4:0), pois perfazem cerca de 90-95% dos AGCC encontrados no cólon.

A obesidade é uma doença crônica e heterogênea, que se apresenta sob diferentes fenótipos. Para a mesma faixa de adiposidade corporal encontramos indivíduos com diferentes perfis cardiometabólicos (Stefan, 2020). Considerando que a obesidade é caracterizada por um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau, com uma produção aumentada de radicais livres e associada com piora na homeostase da glicose, recentemente, foram identificados cinco biomarcadores relacionados ao ganho de peso e presentes no plasma sanguíneo de indivíduos com excesso de peso corporal: di-hidrobiopterina, argininosuccinato, ácido 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanpropanóico (CMPF), prostaglandina (PGB2) e um metabólito de leucotrieno (Carboxi-LTB4) por análise metabolômica (Dias-Audibert et al.2020).

Diante do papel dos AGCC na fisiopatologia da obesidade e da caracterização destes cinco biomarcadores em indivíduos com excesso de peso, é relevante compreender sua distribuição em em mulheres jovens, que ainda não sofreram as consequências metabólicas da menopausa, distribuídas entre os fenótipos magro

metabolicamente saudável (MHNW), magro metabolicamente não saudável (MUNW), sobrepeso/obeso metabolicamente saudável (MHO) e sobrepeso/obeso metabolicamente não saudável (MUO).

OBJETIVO:

Investigar os perfis plasmático de AGCC e de biomarcadores relacionados ao ganho de peso em mulheres com diferentes fenótipos metabólicos e de adiposidade participantes do *Nutritionist's Health Study (NutriHS)*.

METODOLOGIA:

Esta pesquisa é parte do NutriHS, sediado na Faculdade de Saúde Pública da USP, com um braço em desenvolvimento na UNICAMP, com delineamento transversal e amostra de conveniência. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da UNICAMP (CAAE 79775817.4.1001.5404). Participaram do estudo 111 mulheres, as quais preencheram os critérios de inclusão (sexo feminino, idade entre 18 e 45 anos, índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 40 kg/m² e ser estudante de nutrição ou nutricionista) e exclusão: gestação e lactação, presença de diabetes, uso de medicamentos com efeito na glicemia e na sensibilidade à insulina, evidência clínica ou laboratorial de doença cardíaca, renal, hepática e de doença sistêmica grave.

Para avaliação antropométrica considerou-se peso normal: IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m² e excesso de peso: IMC \geq 25 kg/m², (OMS, 2016). A circunferência de cintura (CC) foi aferida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, sendo o valor de 80 cm considerado elevado (OMS, 2008).

A avaliação bioquímica incluiu glicemia e insulina plasmáticas de jejum, em que se utilizou um analisador de glicose (YSI 2700; YSI Life Sciences, Yellow Spring, OH, USA), e uso de ensaio imunométrico automatizado de dois locais quimioluminescentes (Immulite 1000 System; Siemens Health Diagnostics, EUA), respectivamente. A hemoglobina glicada foi avaliada por cromatografia líquida de alto desempenho. O perfil lipídico plasmático foi avaliado por métodos colorimétricos e enzimáticos, e o LDL-colesterol foi calculado de acordo com a equação de Friedwald et al. (1972). A pressão arterial foi aferida em posição sentada usando um esfigmomanômetro de mercúrio e seguiu-se os parâmetros das atuais diretrizes (Muntner et al, 2019).

Os fenótipos foram definidos a partir do IMC (peso normal ou sobrepeso/obesidade) e do estado de saúde metabólica: pressão arterial sistólica \geq 130 mmHg ou pressão arterial diastólica \geq 85 mmHg ou medicação anti-hipertensiva; glicemia de jejum \geq 110 mg/dL ou uso de antidiabético; colesterol HDL $<$ 50 mg/dL; triglicérides \geq 150 mg/dL ou uso de hipolipemiante e doença cardiovascular. A alteração de um único parâmetro caracterizou ausência de saúde metabólica (van Vliet-Ostaptchouk et al., 2014).

A amostra de sangue para análise dos AGCC foi obtida após jejum de 12 horas, usando tubo com heparina de lítio, com centrifugação por 13 min. para aliquotagem do plasma e acondicionamento em freezer -80 graus C. Utilizou-se análises cromatográficas em espectrômetro de massa (modelo GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu), seguindo a metodologia proposta por Wang et al., (2019). As dosagens de acetato e propionato foram realizadas para todos os participantes, o mesmo não foi possível para o butirato, pois não houve detecção de suas concentrações. A determinação dos biomarcadores relacionados ao ganho de peso (di-hidrobiopterina, argininosuccinato, CMPF, PGB2 e Carboxi-LTB4) foi feita por metabolômica, utilizando espectrometria de massa, segundo metodologia de Pang et al., 2021.

As análises estatísticas foram realizadas no software IBM-SPSS. O teste Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a normalidade dos dados e estes foram apresentados de acordo com a mediana e faixas

interquartílicas ou média e desvio-padrão. As comparações entre os fenótipos foram feitas pelos testes de Kruskal Wallis, ANOVA e post hoc de Duncan. Para análise de dados da metabolômica foi feita análise supervisionada multivariada por *Partial Least Square-Discriminant Analysis* (PLS-DA), em que foram identificadas diferenças entre os fenótipos através de espécies de *m/z* discriminantes. Posteriormente foi realizada análise univariada por Volcano Plot, gerando um heatmap para verificar as diferenças entre os fenótipos para os biomarcadores estudados, sendo ambas realizadas através do software MetaboAnalyst 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A maior parte da amostra foi composta de Nutricionistas (60,4%), seguida de estudante de Nutrição (39,4%). A mediana de idade foi de 28 anos e não houve diferenças entre os quatro fenótipos para esta variável. A Tabela 1 mostra a caracterização da amostra dividida entre os fenótipos metabólicos. Para os AGCC totais e acetato não houve diferença significativa entre os fenótipos. O propionato apresentou-se aumentado no fenótipo MHNW em comparação aos fenótipos MHO e MUO ($p=0,023$). Telle-Hansen et al. (2020) demonstraram maiores concentrações de propionato em indivíduos MHO em comparação aos MUO, enquanto acetato e butirato não diferiram entre os dois fenótipos. Este estudo avaliou uma amostra pequena, mas composta exclusivamente por indivíduos obesos, não incluindo sobrepeso como no presente estudo.

Tabela 1. Caracterização clínica, antropométrica, bioquímica e perfil de AGCC categorizadas de acordo com os fenótipos metabólicos da obesidade nas mulheres estudadas (n = 111) do NutriHS São Paulo, Brasil.

VARIÁVEIS	MHNW (a) n=39	MUNW (b) n=18	MHO (c) n=26	MUO (d) n=28	p
IMC (kg/m ²)	21 (20-22) ^{c,d}	22 (20-23) ^{c,d}	27 (26-29)	29 (27-30)	< 0,001
CC (cm)	70 (69-72) ^{c,d}	74 (72-79) ^{c,d}	85 (81-91)	88 (83-94)	<0,01
Glicemia Jejum (mg/dL)	82 (78-85) ^{c,d}	82 (78-87) ^{c,d}	85 (84-88)	88 (83-91)	<0,001
Insulina Jejum (uUI/mL)	4 (92-5) ^{a,b,c}	5 (3-9)	7,1 (4-8)	7 (5-11)	<0,001
HbA1c (%)	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,4	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,3	0,07
Colesterol Total (mg/dL)	168 ± 31	164 ± 24	184 ± 34	166 ± 40	0,12
LDL Colesterol (mg/dL)	88 ± 25	89 ± 24	104 ± 29	95 ± 28	0,11
HDL Colesterol (mg/dL)	66 (56-71)	49 (47-63)	62 (54-72)	46 (43-51) ^{a,b,c}	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	68 (56-87) ^d	76 (62-153)	76 (64-106)	89 (73-157)	0,04
PAS (mmHg)	110 (100-110)	110 (100-120)	110 (100-110)	110 (100-110)	0,73
PAD (mmHg)	70 (60-80) ^d	70 (70-80)	70 (70-80)	80 (70-80)	0,01
Acetato (mg/g)	0,14 (0,10-0,18)	0,14 (0,12-0,19)	0,13 (0,10-0,16)	0,13 (0,10-0,18)	0,351
Propionato (mg/g)	0,011 (0,002-0,014) ^{c,d}	0,005 (0,002-0,011)	0,003 (0,001-0,011)	0,002 (0,001-0,010)	0,023
AGCC Total (mg/g)	0,19 (0,15-0,21)	0,18 (0,14-0,20)	0,15 (0,12-0,18)	0,18 (0,14-0,20)	0,444

Dados apresentados em mediana (percentis 25 - 75) e média (desvio padrão). A, $p < 0,05$ versus MHNW; B, $p < 0,05$ versus MUNW; C, $p < 0,05$ versus MHO; D $p < 0,05$ versus MUO. MHNW, peso normal metabolicamente saudável; MUNW, peso normal metabolicamente não saudável; MHO, sobrepeso / obeso metabolicamente saudável; MUO, sobrepeso / obeso metabolicamente não saudável. IMC: Índice de Massa Corporal, CC: Circunferência de Cintura, HbA1c: hemoglobina glicada, PAS: Pressão Arterial Sistólica, PAD: Pressão Arterial Diastólica, AGCC: Ácidos Graxos Cadeia Curta.

Dentre os cinco metabólitos relacionados ao ganho de peso estudados, somente o argininosuccinato não foi encontrado nas amostras estudadas. Ao contrário da hipótese inicial, os fenótipos MHO e MUNW apresentaram maiores taxas de aparecimento para a maioria dos metabólitos investigados, em comparação ao fenótipo MUO, uma vez que estes metabólitos são marcadores de um pior quadro metabólico relacionado à obesidade ($p < 0,05$). A prostaglandina B2 é um metabólito do ácido araquidônico e a sua presença induz a formação de fatores pró-inflamatórios como interleucina-6 e ativação de fator nuclear kappa B (Dias-Audibert

et al., 2020). O biomarcador metabólito de leucotrieno carboxi-LTB4 é um potente mediador lipídico, capaz de desenvolver quimiotaxia e liberação de espécies reativas de oxigênio, relacionando-se com perfil inflamatório e o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2 e dislipidemia (Finn, 2015).

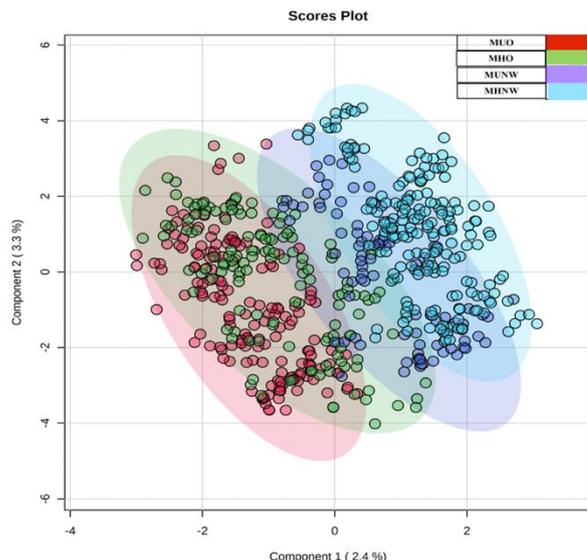


Figura 1: Gráfico de dispersão do *Partial Least Square-Discriminant Analysis* para distinguir os fenótipos metabólicos. Magro metabolicamente saudável (MHNW), magro metabolicamente não saudável (MUNW), sobrepeso/obeso metabolicamente saudável (MHO) e sobrepeso/obeso metabolicamente não saudável (MUO). O *Partial Least Square-Discriminant Analysis* foi realizado com base em cinco biomarcadores relacionados ao ganho de peso.

Para os metabólitos di-hidrobiopterina e ácido 3-carboxi-4metil-5propil-2furanopropanoico (CMPF), as participantes com o fenótipo MHNW apresentaram menor taxa de aparecimento em comparação ao fenótipo MUNW ($p < 0,05$). A presença de di-hidrobiopterina indica maior estado de estresse oxidativo e consequente maior produção de radicais livres que podem induzir e aumentar o processo inflamatório, modificar os ácidos graxos da membrana fosfolipídica, alterando sua fluidez. Também, induz a fosfolipase A ao aumentar a produção de metabólitos, como ácido araquidônico. Ademais, o metabólito CMPF possui relação com disfunção de células beta e o desenvolvimento de diabetes (Dias-Audibert et al., 2020).

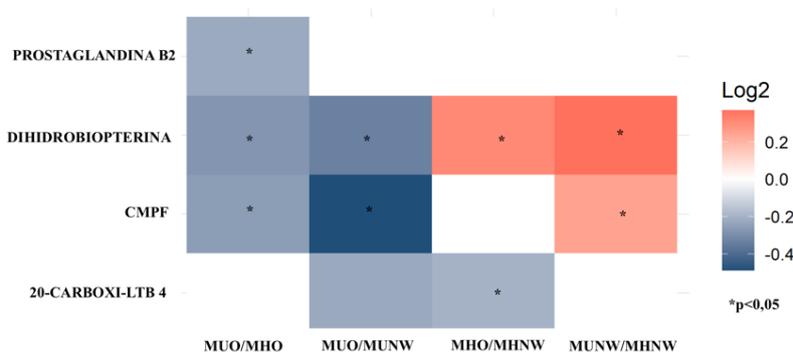


Figura 2: Biomarcadores relacionados ao ganho de peso corporal e a relação entre dois fenótipos metabólicos. A cor azul mostra relação negativa entre dois fenótipos, significando que o segundo fenótipo apresenta maior concentração do metabólito em questão. A cor laranja mostra relação positiva entre dois fenótipos, assim, o fenótipo presente no numerador apresenta maior concentração do metabólito referido. Cor branca mostra concentração da substância em questão igual para os dois fenótipos comparados. Presença do asterisco (*) mostra significância na concentração do biomarcador na relação entre os grupos. Magro metabolicamente saudável (MHNW), magro metabolicamente não saudável (MUNW), sobrepeso/obeso metabolicamente saudável (MHO) e sobrepeso/obeso metabolicamente não saudável (MUO).

CONCLUSÕES:

A hipótese de que os AGCC e os metabólitos relacionados ao ganho de peso estivessem reduzidos e aumentados, respectivamente, nas participantes MUNW e MUO foi parcialmente comprovada. O fato da amostra ter sido composta por mulheres com alterações cardiometabólicas de baixa severidade pode ter contribuído para este achado. Por outro lado, a maior taxa de aparecimento de alguns biomarcadores nas participantes MHO e MUNW em comparação às MUO sugere a presença de inflamação subclínica e sua cronicidade, que poderão ser a base para o desenvolvimento do ganho ponderal e de doenças relacionadas.

BIBLIOGRAFIA:

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2019.

Brown, R. E., Sharma, A. M., Arden, C. I., et al. Secular differences in the association between caloric intake, macronutrient intake and physical activity with obesity. *Obes Res Clin Pract*; 10: 243 – 255, 2016.

Chen, H., Tseng, Y. J., Wang, S., et al. The metabolome profiling and pathway analysis in metabolic healthy and abnormal obesity. *International Journal of Obesity*, 39: 1241-1248, 2015.

Dias – Audibert F L, Navarro LC, de Oliveira DN, et al. Combining Machine Learning and Metabolomics to identify weight gain biomarkers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; 8:6, 2020.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.

Guilherme A, Virbasiu JV, Puri V, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 9, 367–377, 2008.

Hur, K. Y. e Lee, MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes and Metabolism Journal*; 39: 198 – 203, 2015.

Mancini, M. C., Geloneze, B., Salles, J.E. N., Lima, J. G., Carra, M. K. Tratado de Obesidade. 3º Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2020.

Morrison D. J. e Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 7(3):189-200, 2016.

Muntner P, Einhorn PT, Cushman WC, et al. Blood Pressure Assessment in Adults in Clinical Practice and Clinic-Based Research: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(3):317-35.

Stefan, N. Causes, Consequences, and Treatment of Metabolically Unhealthy Fat Distribution. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 8 (7): 616 – 627, 2020.

Organização Mundial da Saúde. Obesidade e Sobrepeso. 2016. Disponível em: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/ Acesso em: 18 de agosto de 2021.

Organização Mundial da Saúde. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio; Report of a WHO Expert Consultation, 2008.

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, Volume 49: 1: 388–396, 2021.

Telle-Hansen VH, Christensen JJ, Formo GA, et al. A Comprehensive metabolic profiling of the metabolically healthy obesity phenotype. *Lipids in Health and Disease* 2020;19(1):1-12.

van Vliet-Ostaptchouk JV, Nuotio ML, Slagter SN, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord*; 14:9. 2014.

Wang, R., Fan, C., Fan, X., et al. A fast accurate way to determine short chain fatty acids in human serum by GC – MS and their distribution in children with digestive diseases. *Chromatographia*; 83: 273 – 286, 2019.