



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS



Alzira Aparecida Pereira

**Avaliação de *Firmicutes* e *Clostridium* na microbiota de
mulheres no climatério e sua relação com a síndrome
metabólica.**

Ouro Preto

2021

Alzira Aparecida Pereira

Avaliação de *Firmicutes* e *Clostridium* na microbiota de mulheres no climatério e sua relação com a síndrome metabólica.

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Guerra de Sá
Coorientadora: Thayane Christine Alves da Silva

**Ouro Preto
2021**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436a Pereira, Alzira Aparecida.

Avaliação de Firmicutes e Clostridium na microbiota de mulheres no climatério e sua relação com a síndrome metabólica.. [manuscrito] / Alzira Aparecida Pereira. - 2022.

66 f.: il.: color., gráf., tab.. + Quadro. + Fluxograma.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota.

Coorientadora: Ma. Thayane Christine Alves Da Silva.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Climatério. 2. Síndrome Metabólica. 3. Saúde da mulher. I. Cota, Renata Guerra de Sá. II. Da Silva, Thayane Christine Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 574

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Alzira Aparecida Pereira

Avaliação de *Firmicutes* e *Clostridium* na microbiota de mulheres no climatério e sua relação com a síndrome metabólica

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 12 de janeiro de 2022.

Membros da banca

Dra Renata Guerra de Sá Cota- Orientador- Universidade Federal de Ouro Preto
Ms. Deborah Campos Oliveira- Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto
Dra. Camila Carrião Machado Garcia- Universidade Federal de Ouro Preto

Dra Renata Guerra de Sá Cota, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 12/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Renata Guerra de Sa Cota, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/01/2022, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0267537** e o código CRC **47715FAC**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.000254/2022-39

SEI nº 0267537

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir durante todo o caminho, por ter colocado pessoas tão boas para compartilhar essa trajetória ao meu lado.

Aos meus pais Adilson e Angélica a quem devo tudo que sou, sem o sacrificio diário de vocês nada disso seria possível, obrigada por tanto amor e compreensão.

A minha família em Ouro Preto, Andréa, Catharina e Irene obrigada por cada momento, morar com vocês foi uma imensa alegria.

Aos meus amigos, Ubiratan, Raquel, Karol, Ana, João, Laisy e Diego não imagino melhores pessoas para viver essa fase da minha vida, obrigada pela parceria.

A minha orientadora Renata e minha coorientadora Thayane, obrigada pelos ensinamentos, pela compreensão e pela paciência foi uma honra estar ao lado de mulheres tão excepcionais.

As integrantes do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço pelo aprendizado e carinho.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

O climatério é a fase do envelhecimento da mulher que marca a transição do estado reprodutivo para o não reprodutivo. Essa fase é marcada por alterações hormonais que provocam sintomas físicos e psicológicos. Nesse período as mulheres possuem maiores chances de desenvolver síndrome metabólica, um transtorno que representa um conjunto de fatores de risco cardiovascular associados a deposição central de gordura e a resistência à insulina. Diversos fatores podem contribuir para o aparecimento dessa condição na fase do climatério podendo ser destacado modificações na microbiota intestinal. Objetivo: Quantificar o filo Firmicutes e o gênero Clostridium em amostras fecais de mulheres em fase de climatério, a fim de avaliar se há mudanças no perfil dessa microbiota entre as fases pré menopausa e pós-menopausa e na presença de síndrome metabólica. Estudo transversal, de base populacional, alinhado a uma coorte de mulheres da cidade de Ouro Preto, MG, realizado entre os anos 2020 a 2021. Métodos: Inicialmente uma coorte de 37 mulheres com idades entre 41 a 61 anos e no climatério foram classificadas em três grupos: Síndrome Metabólica (SM=13), Obeso/Sobrepeso sem síndrome metabólica (OB/SB=13) e Eutróficas (EU=11). Essa coorte também foi classificada conforme o estágio de envelhecimento reprodutivo STRAW, em pré-menopausa e pós-menopausa. Foram realizadas entrevistas, coletas de sangue para avaliações bioquímicas, hormonais e metabólicas. Resultados: Dados sociodemográficos apresentaram uma relação entre baixo grau de escolaridade presença de síndrome metabólica nas mulheres. Parâmetros glicometabólicos apresentaram diferença significativa entre os grupos, e índices metabólicos como o Índice de Castelli (IC), Índice de resistência a insulina (HOMA-IR), Índice de Massa corporal (IMC) ($p < 0,05$). Na análise de qPCR referente a quantificação de *Firmicutes* e *Clostridium* não foi encontrada diferença estatística significativa. Ainda no grupo SM foi encontrada correlação entre Firmicutes e cálcio ($r=0,726$, $p=0,0049$) e Firmicutes e LH ($r=0,717$, $p=0,0058$). O mesmo grupo de mulheres apresentou correlação entre Clostridium e cálcio ($r=0,601$, $p=0,0295$) e Clostridium e LH ($r=0,589$, $p=0,0340$). No grupo de mulheres eutróficas foi encontrado correlação entre Firmicutes e TSH ($r=-0,671$, $p=0,0237$). Em conjunto, conclui-se que mulheres portadoras de síndrome metabólica que estão no climatério sofrem alterações bioquímicas, hormonais e metabólicas. Este é o primeiro estudo em Minas Gerais de base populacional que investiga o desenvolvimento da síndrome metabólica relacionada com o status menopausal e a microbiota intestinal. Esperamos que com o aumento do N amostral seja possível transpor seus resultados para populações semelhantes.

Palavras-chaves: Climatério; Síndrome Metabólica; Microbiota; *Firmicutes*; *Clostridium*.

ABSTRACT

Climacteric is the phase of aging of women that marks the transition from the reproductive to the non-reproductive state. This phase is marked by hormonal changes that cause physical and psychological symptoms. During this period, women are more likely to develop metabolic syndrome, a disorder that represents a set of cardiovascular risk factors associated with central fat deposition and insulin resistance. Several factors can contribute to the onset of this condition in the climacteric phase, with changes in the intestinal microbiota being highlighted. Objective: To quantify the phylum Firmicutes and the genus *Clostridium* in fecal samples from climacteric women, in order to assess whether there are changes in the profile of this microbiota between the pre-menopausal and post-menopausal phases and in the presence of metabolic syndrome. Cross-sectional, population-based study, aligned with a cohort of women from the city of Ouro Preto, MG, carried out between 2020 and 2021. Methods: Initially, a cohort of 37 women aged between 41 and 61 years old and in menopause were classified as three groups: Metabolic Syndrome (MS=13), Obese/Overweight without metabolic syndrome (OB/SB=13) and Eutrophic (EU=11). This cohort was also classified according to the stage of reproductive aging STRAW, into pre-menopause and post-menopause. Interviews, blood collections for biochemical, hormonal and metabolic evaluations were carried out. Results: Sociodemographic data showed a relationship between low education and the presence of metabolic syndrome in women. Glycometabolic parameters showed significant differences between groups, and metabolic indices such as Castelli Index (CI), Insulin Resistance Index (HOMA-IR), Body Mass Index (BMI) ($p < 0.05$). In the qPCR analysis regarding the quantification of Firmicutes and *Clostridium*, no statistically significant difference was found. Also in the MS group, a correlation was found between Firmicutes and calcium ($r=0.726$, $p=0.0049$) and Firmicutes and LH ($r=0.717$, $p=0.0058$). The same group of women showed a correlation between *Clostridium* and calcium ($r=0.601$, $p=0.0295$) and *Clostridium* and LH ($r=0.589$, $p=0.0340$). In the group of eutrophic women, a correlation was found between Firmicutes and TSH ($r=-0.671$, $p=0.0237$). Together, it is concluded that women with metabolic syndrome who are in the climacteric undergo biochemical, hormonal and metabolic changes. This is the first population-based study in Minas Gerais that investigates the development of metabolic syndrome related to menopausal status and intestinal microbiota. We hope that with the increase in sample N, it will be possible to transpose their results to similar populations.

Key words: Climacteric; Metabolic Syndrome; Microbiota; *Firmicutes*; *Clostridium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma dos hormônios envolvidos na transição menopausal.....	15
Figura 2: Estágios do Envelhecimento Reprodutivo (STRAW +10).....	18
Figura 3: Curva Padrão obtida a partir da amplificação de diferentes concentrações de DNAg bacteriano utilizando <i>Primer</i> para as regiões hipervariáveis V3-V4.....	29
Figura 4: Análise feita por meio da técnica de eletroforese em gel para avaliar da integridade do DNAg extraído de amostras fecais.	37
Figura 5: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de <i>Firmicutes</i> e <i>Clostridium</i> no grupo mulheres com síndrome metabólica (SM) entre as fases reprodutivas.	38
Figura 6: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de <i>Firmicutes</i> e <i>Clostridium</i> no grupo mulheres Obesas e com Sobrepeso sem síndrome metabólica (OB/SB) entre as fases reprodutivas.	40
Figura 7: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de <i>Firmicutes</i> e <i>Clostridium</i> no grupo de mulheres Eutróficas entre as fases reprodutivas.....	41
Figura 8: Análise comparativa do número de cópias de DNA bacteriano de <i>Firmicutes</i> entre os estágios de envelhecimento reprodutivo.....	42
Figura 9: Análise comparativa do número de cópias de DNA bacteriano de <i>Clostridium</i> entre os estágios de envelhecimento reprodutivo e entre os grupos.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 2: Hormônios associados ao período de Pré-menopausa e Pós-menopausa.	15
Quadro 3: Terminologias e definições relacionadas ao período do climatério e menopausa segundo a Sociedade Internacional de Menopausa e a Organização Mundial da Saúde.	16
Quadro 4: Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III.	22
Quadro 5: Índices metabólicos utilizados na avaliação dos grupos SM, OB/SB e Eutróficas.	22
Quadro 6: Sequência de <i>primers</i> utilizados no estudo.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil sociodemográfico referente aos grupos: Síndrome Metabólica, Obeso/Sobrepeso e grupo Eutróficas. Mantida a classificação de Pré menopausa e Pós-menopausa em cada grupo.....	31
Tabela 2: Análises bioquímicas para os grupos Síndrome metabólica, Obeso/Sobrepeso e Eutróficas.....	33
Tabela 3: Análises hormonais para os grupos SM, OB/SB e Eutróficas.....	35
Tabela 4: Índices metabólicos para os grupos Síndrome metabólica, Obeso/Sobrepeso e Eutróficas.....	36
Tabela 5: Avaliação da qualidade e pureza do DNAg extraído das amostras fecais.	37
Tabela 6: Correlações entre níveis de <i>Firmicutes</i> e <i>Clostridium</i> nos grupos SM, OB/SB e Eutróficas com variáveis bioquímicas e hormonais.	44
Tabela 7: Correlações entre níveis de <i>Firmicutes</i> e <i>Clostridium</i> nos grupos SM, OB/SB e Eutróficas com variáveis metabólicas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ApoA: Apolipoproteína A

ApoB: Apolipoproteína B

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CT: Ciclo Treshold

DCV: Doenças Cardiovascular

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EU: Eutróficas

FMP: Período Menstrual Final

FSH: Hormônio Folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

GSM: Síndrome Geniturinária

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade

HMP: Projeto Microbioma Humano

HOMA-IR: Índice de Resistência a Insulina

IBD: Doença Inflamatória Intestinal

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Índice de Castelli

IMC: Índice de Massa Corporal

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade

LH: Hormônio Luteinizante

LPA: Lipoproteína A

LPS: Lipopolissacarídeo

OB/SB: Obeso/ Sobrepeso

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCR: Proteína C reativa

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SM: Síndrome Metabólica

STRAW: *Stages of Reproductive Aging Workshop*

SUS: Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	O climatério e suas alterações hormonais	14
2.2	Esclarecendo as definições relacionadas ao período do climatério.....	16
2.3	Microbiota e sua relação com a alimentação.....	18
2.4	O filo <i>firmicutes</i> abriga um gênero de destaque: o <i>clostridium</i>	20
2.5	Síndrome metabólica.....	21
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo geral.....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	Delineamento do estudo	26
5.2	CrITÉRIOS de exclusão	26
5.3	Coleta de fezes.....	27
5.4	Análise bioquímica	27
5.5	Extração de DNA	27
5.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
5.7	Quantificação por pcr em tempo real (qPCR).....	29
5.8	Análises estatísticas	30
6	RESULTADOS	31
6.1	Dados sociodemográficos	31
6.2	Analitos bioquímicos	32
6.3	Analitos hormonais.....	35

6.4	Índices metabólicos.....	36
6.5	Avaliação do DNA extraído	36
6.6	Quantificação do filo <i>Firmicutes</i> e gênero <i>Clostridium</i> por metodologia de qPCR..	38
6.7	Correlações para o filo <i>Firmicutes</i> e gênero <i>Clostridium</i> com os parâmetros bioquímicos, hormonais e metabólicos.	44
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÃO.....	54
9	PERSPECTIVAS.....	55
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
11	ANEXOS	63
11.1	Anexo a: aprovação comitê de ética em pesquisa (CEP/UFOP)	63

1 INTRODUÇÃO

O climatério refere-se a fase do envelhecimento da mulher que marca a transição do estado reprodutivo para o estado não reprodutivo (BRASIL,2008). É um processo biológico e não patológico (BRASIL, 2008), ocorre por volta dos 40 aos 65 anos de idade. Esse período tem seu marco na menopausa que se caracteriza pela última menstruação seguido por doze meses consecutivos sem nenhuma ocorrência de episódio menstrual (BRASIL, 2008). Nessa fase ocorre o decaimento nos níveis de estrogênio, isso acontece devido a falência ovariana e provoca vários sintomas físicos e psicológicos nas mulheres como ondas de calor, insônia, fadiga, irritabilidade, depressão, sudorese, palpitações, cefaleia, esquecimento, problemas urinários, estresse, transtornos como desajustes conjugais, problemas familiares e, também, alterações na sexualidade, dentre outros (BRASIL, 2008).

O hipoestrogenismo também está relacionado ao aumento de gordura abdominal e subcutânea em mulheres na menopausa (TOTH *et al.*, 2000). Além de se relacionar com o aumento de peso, a queda desse hormônio pode influenciar o aumento nas taxas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição na lipoproteína de alta densidade (HDL). Essas circunstâncias acabam por favorecer um ambiente propício para o surgimento de dislipidemia, aterosclerose, doença coronariana, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, que são algumas das principais causas de mortalidade feminina (BRASIL, 2008).

A dislipidemia se caracteriza por aumento do colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade, baixos níveis de HDL entre outros. A alimentação tem total impacto na alteração dessa bioquímica, sendo necessário entender todos os mecanismos envolvidos nesse processo. A alimentação também tem influência direta sobre a microbiota intestinal e a saúde do indivíduo. A microbiota intestinal é formada por um ecossistema de microrganismos como vírus, bactérias e fungos que estão presentes no trato gastrointestinal (TGI).

Existem quatro filos que são predominantes na microbiota intestinal adulta sendo eles, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (D'ARGENIO; SALVATORE, 2015). Um estudo associou uma dieta mais rica em gordura a uma redução de *Firmicutes* e um aumento de *Bacteroidetes* (WAN *et al.*, 2019). *Clostridium* é um dos gêneros mais estudados dentro de *Firmicutes*, esse gênero tem função modeladora e a alta ingestão de ácidos graxos monoinsaturados se relaciona com seu aumento na microbiota intestinal (FURUHASHI *et al.*, 2007, JAMAR *et al.*,2018). JAMAR *et al* (2018) também associou o aumento de *Clostridium sp* na microbiota intestinal a indivíduos obesos com síndrome metabólica. Essa síndrome pode

ser definida como um transtorno que representa um conjunto de fatores de risco cardiovascular associados a deposição central de gordura e a resistência à insulina, sendo responsável pelo aumento de mortes por motivos cardiovasculares na população feminina. Além disso estudos como o de Gaspard; Gottal; Van Den Brûle (1995) relacionam o aumento de síndrome metabólica a mulheres que estão no período de transição menopausal, sendo ainda associado o aumento dos triglicérides, do LDL, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e ao aumento da lipoproteína A (Lpa).

Diante de tantos problemas relacionados a síndrome metabólica e ao climatério se faz necessário o estudo e entendimento desse transtorno e desse período, a fim de compreender fatores que podem melhorar e ajudar as mulheres nessa fase. Logo, a hipótese do trabalho foi que mulheres classificadas como portadoras de síndrome metabólica e que estão no climatério possuem em sua microbiota intestinal uma maior quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* que pertencem à *Firmicutes*. O objetivo geral desse trabalho foi quantificar o filo *Firmicutes* e o gênero *Clostridium* em amostras fecais de mulheres em fase de climatério, a fim de avaliar se há mudanças no perfil dessa microbiota entre as fases pré menopausa e pós-menopausa e na presença de síndrome metabólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Climatério e suas alterações hormonais

O climatério refere-se a fase do envelhecimento da mulher que marca a transição do estado reprodutivo para o estado não reprodutivo (BRASIL,2008). É um processo biológico e não patológico (BRASIL, 2008) e ocorre por volta dos 40 aos 65 anos de idade. Esse período tem seu marco na menopausa, que se caracteriza pela última menstruação seguido por doze meses consecutivos sem nenhuma ocorrência de episódio menstrual (BRASIL, 2008). Nessa etapa ocorre uma diminuição dos níveis estrogênicos e a queda desse hormônio acaba por afetar o equilíbrio físico, social, espiritual e emocional das mulheres (OLIVEIRA JÚNIOR, 2012).

Além disso durante o climatério a maioria das mulheres passam por sintomas característicos do período como fogachos descritos como ondas de calor, insônia, fadiga, irritabilidade, depressão, sudorese, palpitações, cefaleia, esquecimento, problemas urinários, estresse, transtornos como desajustes conjugais, problemas familiares e, também, alterações na sexualidade, dentre outros (BRASIL, 2008). De acordo com Pedace (1992) em geral, as mulheres não se referem ao termo climatério, normalmente elas apontam sintomas físicos, ou psicológicos que são observados nessa fase, a maioria delas não compreende o desequilíbrio hormonal que está acontecendo em seus corpos.

O processo que acontece no corpo feminino no período da transição menopausal é que os ovários se tornam menos sensíveis aos estímulos gonadotróficos. Os folículos ovarianos (células da granulosa) diminuem a produção de inibina, hormônio que é antagonista ao hormônio folículo estimulante (FSH) e por isso faz com que esse se eleve, os níveis de estradiol permanecem normais ou relativamente baixos. Essas alterações hormonais provocam o encurtamento da fase folicular que é dependente do estrogênio e assim os ciclos menstruais ficam mais curtos. Os níveis de FSH começam a aumentar por causa da atresia do folículo ovariano e isso causa a diminuição do estrogênio. Isso é um feedback negativo já que a quantidade de estrogênios na corrente sanguínea diminui, em especial o estradiol, o hipotálamo libera mais hormônio liberador de gonadotrofina (GnRh) e assim a adeno-hipófise recebe sinal para liberar mais FSH, mas não existe folículos suficientes para a produção. Na pós- menopausa o FSH pode aumentar cerca de 10 a 15 vezes, os níveis de estradiol reduzem em até 80% e vai sendo substituído pela estrona hormônio que predomina nessa fase (TORRES JIMENEZ, ANA PAOLA & TORRES RINCON, 2018) (Figura 1).

Figura 1: Fluxograma dos hormônios envolvidos na transição menopausal.



Fonte: Adaptado de (TORRES JIMENEZ, ANA PAOLA & TORRES RINCON, 2018)

Legenda: FSH: Hormônio Folículo estimulante.

↓ Redução ↑ Aumento

Quadro 1: Hormônios associados ao período de Pré-menopausa e Pós-menopausa.

Hormônio	Pré-menopausa		Pós-menopausa
	Mínimo	Máximo	Média
Estradiol	50	500pg/ml	5-25pg/ml
Estrona	30	300pg/ml	20-60pg/ml
Androstenediona	*	2,0ng/ml	0,3-1,0ng/ml
Testosterona	*	0,30-8ng/ml	0,1-0,5ng/ml
Progesterona	0,5	20ng/ml	0,5ng/ml

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2008)

Legenda: *: Manual não cita valor mínimo preconizado.

Existem muitos relatos de mulheres sobre como a qualidade de vida nessa fase é afetada, a partir disso surgiram vários estudos investigando alguns fatores que se relacionem com a melhora e ou piora na qualidade de vida. De acordo com DE LORENZI *et al.*, (2006), em uma pesquisa realizada no Brasil com 323 mulheres na pós-menopausa, a qualidade de vida foi observada como inferior em mulheres com baixa escolaridade, menor renda per capita, que não realizavam atividade física e que possuíam comorbidades.

É evidente as transformações hormonais que acontecem no corpo feminino durante esse período, o hipoestrogenismo por exemplo, está relacionado ao aumento do depósito de gordura abdominal. De acordo com Toth *et al.*, (2000) existe um aumento de 49% da gordura abdominal e 22% da subcutânea em mulheres na pós-menopausa em comparação ao menacme. Além disso a baixa desse hormônio pode influenciar o aumento dos níveis de colesterol e triglicérides, ocasionando um aumento nas taxas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição na lipoproteína de alta densidade (HDL). Essas circunstâncias acabam por favorecer um ambiente

propício para o surgimento de dislipidemia, aterosclerose, doença coronariana, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, que são algumas das principais causas de mortalidade feminina (BRASIL, 2008).

Em mulheres na pós-menopausa, o aumento da idade e a queda do estrogênio acaba por acarretar um aumento no surgimento de peso, por isso estudos como o de Gaspard; Gottal; Van Den Brûle (1995) relacionam a síndrome metabólica ao período do climatério. De acordo com essa pesquisa a síndrome metabólica está associada ao período de transição menopausal, sendo correlacionadas ao aumento dos triglicerídeos, do LDL, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e ao aumento da lipoproteína A (Lpa).

A população brasileira é composta em sua maioria por mulheres, cerca de 51,03% (IBGE, 2010; BRASIL), junto a isso tem-se o aumento da expectativa de vida que passou de 64 anos em 1990 para 75 anos em 2018, sendo que elas vivem aproximadamente cinco anos a mais do que os homens (OMS, 2018) o que significa mais mulheres vivenciando o período do climatério. Esses dados evidenciam a importância de mais estudos nessa área a fim de compreender e ajudar a melhorar a qualidade de vida das mulheres nessa fase da vida.

2.2 Esclarecendo as definições relacionadas ao período do climatério

A palavra climatério não era muito compreendida sendo assim usada de forma indevida gerando confusão entre os profissionais de saúde, pesquisadores, mídia e o público. Em 1999 a Sociedade Internacional de Menopausa (IMS) se reuniu para complementar uma lista com termos relacionados ao climatério e menopausa e assim padronizar palavras chaves. Essa lista teve seu início em 1976 no primeiro Congresso Internacional da Menopausa, e em 1980 o grupo científico de pesquisa em menopausa da Organização Mundial da Saúde contribuiu com definições, em 1994 essa lista foi revisada sendo publicada pouco depois, em 1996.

Quadro 2: Terminologias e definições relacionadas ao período do climatério e menopausa segundo a Sociedade Internacional de Menopausa e a Organização Mundial da Saúde.

Terminologia	Definição
Menopausa (natural)	Interrupção definitiva da menstruação. Se caracteriza com a última menstruação seguida por doze meses consecutivos de amenorreia.

Síndrome do climatério	Quando em sua maioria, o período do climatério se associa a sintomatologia.
Climatério	A transição da fase reprodutiva para o estado não reprodutivo da mulher.
Transição da menopausa	Período de tempo antes do período menstrual final (FMP).
Perimenopausa	Compreende o período anterior a menopausa e o primeiro ano após a menopausa.
Pré-menopausa	Período que abrange toda a fase reprodutiva até o FMP.
Pós-menopausa	Usado a partir do período menstrual final, independente se a menopausa foi induzida ou espontânea.

Fonte: Adaptado de WHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH ON THE MENOPAUSE (1996)

Já o Workshop de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo de 2001 (STRAW) propôs uma nomenclatura e um sistema de estadiamento para o envelhecimento ovariano, incluindo critérios hormonais menstruais e qualitativos para definir cada estágio (HARLOW *et al.*, 2012). Novas pesquisas e novos dados surgiram a respeito da função hipotálamo, hipófise e ovários comparando o antes e depois do período menstrual final, e por isso em 2011 foi realizado outro evento o STRAW+10 que revisou e atualizou o modelo já existente.

O STRAW+10 dividiu a vida adulta da mulher em três fases: reprodutiva, transição da menopausa e pós-menopausa. Essas fases foram divididas em estágios centrados em torno do período menstrual final (FMP, Estágio 0). As divisões aconteceram da seguinte forma:

1° Fase reprodutiva: Dividida em estágio -5, -4 e -3 que se refere ao início, pico e final, respectivamente.

2° Transição da menopausa: Dividida em estágio -2 (precoce) e estágio -1 (tardia).

3° Pós-menopausa: Dividida em estágio precoce (+1a, +1b, +1c) e 2 (tardia).

Figura 2: Estágios do Envelhecimento Reprodutivo (STRAW +10)

Estágio	Menarca			FMP (0)						
	-5	-4	-3b	-3a	-2	-1	+1a	+1b	+1c	2
Terminologia	Reprodutiva				Transição Menopausal		Pós Menopausa			
	Precoce	Máxima	Tardia		Precoce	Tardia	Precoce		Tardia	
Duração	Variável				Variável	1-3 anos	2 anos (1+1)		3-6 anos	Vida útil remanescente
CRITÉRIO PRINCIPAL										
Ciclo Menstrual	Variável a regular	Regular	Regular	Mudanças súbitas no fluxo/duração	Duração Variável Diferença persistente ≥ 7 dias na duração de ciclos consecutivos	Intervalo de amenorreia ≥ 60 dias				
CRITÉRIOS DE SUPORTE										
ENDÓCRINOS										
FSH			Normal	Variável*	↑ Variável*	↑ > 25U/L**	↑ Variável*	Estabiliza		
AMH			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito Baixo		
Inibina B			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito Baixo		
Contagem de Folículos Antrais 2-10 mm			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito Baixo	Muito Baixo		
CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS										
Sintomas						Prováveis sintomas vasomotores	Sintomas vasomotores mais prováveis			Aumento dos sintomas de atrofia urogenital

Fonte: Adaptado de (HARLOW *et al.*, 2012)

Legenda: * coleta de sangue do 2º ao 5º dia do ciclo.

↑ Nível elevado.

** Nível esperado aproximado com base em ensaios utilizando os padrões hipofisários.

2.3 Microbiota e sua relação com a alimentação

O termo microbiota refere-se à população de microrganismos como bactérias, vírus e fungos que habitam nosso corpo. O projeto Microbioma Humano (HMP) descreve mais de 10.000 espécies microbianas e 100 trilhões de microrganismos no corpo humano. A microbiota é metabolicamente adaptável e flexível, rapidamente renovável e contribui para o metabolismo e obtenção de energia da dieta (SANTOS; 2015). O corpo humano tem mais microrganismos que células humanas, tornando de fundamental importância a associação equilibrada desses microrganismos com seu hospedeiro (RAMAN *et al.*, 2005).

A microbiota intestinal é formada por um ecossistema de microrganismos que estão

presentes no trato gastrointestinal (TGI), usualmente é denominada utilizando a estratificação hierárquica a qual denomina-se níveis taxonômicos, ou seja: filos, classe, ordem, família, gênero e espécie. Cada indivíduo possui um microbioma único, porém existem 7 filos que compõe essa microbiota, sendo eles *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* e *Actinobacteria*. Dentro deste conjunto estudos sugerem que mais de 90% são predominantemente compostos por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobactérias* (JIAO *et al.*, 2021, D'ARGENIO; SALVATORE, 2015). Por outro lado, vale ressaltar que os gêneros predominantes nesses filos são: (i) *Firmicutes*- *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*; (ii) *Bacteroidetes*- *Bacteroides* e *Prevotella*; (iii) *Proteobacteria*- *Helicobacter* e *Escherichia*.

A alimentação tem influência direta na composição dessa microbiota e na saúde do indivíduo. Os principais produtos metabólicos produzidos pela fermentação anaeróbica dessas bactérias são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os principais AGCC são acetato, propionato e butirato, sendo o primeiro encontrado em maiores concentrações na circulação sanguínea. O propionato auxilia na gliconeogênese no fígado e por fim o butirato é usado como fonte de energia pela mucosa intestinal (LOUIS; FLINT, 2017, MORRISON E PRESTON, 2016). Além disso essa microbiota desempenha funções como digestão de polissacarídeos, desenvolvimento do sistema imunológico, defesa contra infecções entre outros (FLINT *et al.*, 2012, QIN *et al.*, 2010). Como essa microbiota é um ambiente dinâmico ela pode ser influenciada por alguns fatores como idade, dieta, ciclos hormonais terapias e doenças (KOREN *et al.*, 2012, PÉREZ-COBAS *et al.*, 2013).

Na sociedade cresce o consumo de alimentos ricos em gordura e pobres em fibras contribuindo assim para uma alimentação desbalanceada e escassa em nutrientes. Junto a isso têm-se o aumento do sedentarismo, uma grande parte da população não pratica atividade física e esses fatores associados contribuem para o aparecimento de um processo inflamatório de baixo grau. Esse processo acaba por favorecer o aumento de bactérias gram negativas na microbiota intestinal e reduz a população do gênero *Bifidobacterium* e assim contribui para aumento da permeabilidade intestinal (SCHIMIDT, 2017; FLOR, 2017).

Uma pesquisa realizada por Wan *et al.*, (2019) comparou três grupos de adultos jovens saudáveis modificando a proporção entre gordura e carboidratos nas dietas consumidas e constatou que o grupo que se alimentava com mais teor de gordura apresentava a abundância relativa de *Firmicutes* reduzida, enquanto *Bacteroidetes* aumentou. Foi observado também que todos os grupos apresentaram perda de peso, todavia, no grupo em que a dieta possuía baixo

teor de gordura foi mensurado uma maior redução na circunferência da cintura, nos níveis de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa intensidade (LDL-C) e todo o colesterol presente nas partículas de lipoproteínas (não-HDL-C).

Outro estudo realizado por Borgo *et al.*, (2016) identificou que crianças obesas possuíam em sua microbiota intestinal uma maior abundância de *A. muciniphyla*, essa bactéria está relacionada a um excesso de peso em crianças e adolescentes. Essa pesquisa identificou também em crianças obesas bactérias com perfil pró-inflamatório estimuladas por dietas hipercalóricas e hiperglicídicas.

Os estudos descritos mostraram que a alimentação pode induzir importantes modificações na composição da microbiota intestinal. Quando essas modificações acontecem na microbiota podem levar a um quadro de disbiose intestinal que caracteriza o desequilíbrio dessas comunidades de bactérias e pode impactar na saúde do indivíduo afetado.

2.4 O filo *Firmicutes* abriga um gênero de destaque: o *Clostridium*

O filo *Firmicutes* é um dos mais abundantes na microbiota fecal, composto por bactérias gram positivas, e a sua proporção com o filo *Bacteroidetes* tem sido alvo de muitos estudos. Bervoets *et al.*, (2013) investigaram a composição da microbiota intestinal em crianças obesas e magras e como resultado relataram que as crianças obesas possuíam uma maior proporção entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em comparação a crianças magras. Outros autores surgiram refutando essa ideia e associando a alteração dessa microbiota induzida por obesidade a um microbioma com menor diversidade (TURNBAUGH *et al.*, 2009). As bactérias pertencentes a esse filo produzem principalmente butirato, que está relacionado ao aumento de insulina, a atividades anti-inflamatórias, regulação de metabolismo energético e aumento da expressão de leptina (LOUIS; FLINT, 2009; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

Existem mais de 250 gêneros inseridos no filo *Firmicutes*, dentre eles destacam-se *Clostridium* e *Lactobacillus* que estão relacionados a função moduladora e *Mollicutes* que se associa a indução de inflamação (FURUHASHI *et al.*, 2007). *Clostridium* foi citado em 203 espécies e 5 subespécies, esse gênero pode ser classificado em dois grupos, sendo o primeiro composto por microrganismos que concentram sua patogenicidade na produção de toxinas longe do corpo do hospedeiro ou em áreas restritas. Já o segundo grupo produz toxinas menos potentes no intestino e causam doenças denominadas enterotoxemias (GOMES, 2013).

De acordo com JAMAR *et al.*, (2018) a alta ingestão de ácidos graxos monoinsaturados

está relacionado a uma maior quantidade da espécie *C.coccoides* que pertence ao gênero *Clostridium* na microbiota intestinal. Esse mesmo estudo encontrou na microbiota intestinal de obesos com síndrome metabólica uma abundância de espécies de *Clostridium* em relação a indivíduos obesos sem síndrome metabólica.

Estudos vem relacionando algumas espécies do gênero *Clostridium* a idade, de acordo com MARIAT *et al.*, (2009) ao comparar a microbiota intestinal de três grupos, sendo eles: bebês, adultos e idosos, foram encontrados uma alta quantidade de *Clostridium coccoides* nos bebês. Nesse mesmo estudo foi observado uma maior proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em adultos, mostrou-se uma evolução nessa proporção de crianças para adultos e um decréscimo no grupo de adultos para idosos.

O gênero *Clostridium* é um dos gêneros mais estudados dentro do filo *Firmicutes*. Vários estudos, como citado anteriormente, relacionam esse gênero a algumas doenças como a síndrome metabólica por exemplo, podendo ser um importante marcador desse transtorno.

2.5 Síndrome metabólica

Com o aumento na sociedade de indivíduos que possuem síndrome metabólica e levando em conta os riscos cardiovasculares e a mortalidade dessa doença, em 2004 foi estruturado a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Esse documento foi elaborado graças à colaboração entre grandes sociedades médicas como: Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e Associação Brasileira para Estudo da Obesidade (ABESO), (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Essa Diretriz define que a Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno que representa um conjunto de fatores de risco cardiovascular associados a deposição central de gordura e a resistência à insulina. Esse transtorno é responsável pelo aumento da mortalidade cardiovascular.

A I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (SM) recomenda a utilização dos parâmetros e componentes utilizados pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) para diagnóstico de síndrome metabólica (Quadro 3).

Quadro 3: Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III.

	Circunferência abdominal	Triglicerídeos	HDL colesterol	Pressão arterial	Glicemia em Jejum
Homens	> 102 cm	150 mg/dL	< 40 mg/dL	130 mmHg ou ≥ 85 mmHg	≥ 110 mg/dL
Mulheres	> 88 cm	150 mg/dL	< 50 mg/dL	130 mmHg ou ≥ 85 mmHg	≥ 110 mg/dL

Fonte: I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005, (NCEP-ATPIII).

Este estudo usou esses parâmetros recomendados pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento de Síndrome Metabólica para classificar se as mulheres possuíam ou não SM. Foram consideradas portadoras de SM as participantes que apresentaram três dos cinco parâmetros alterados (Quadro 3).

Existem ainda outros parâmetros que devem ser considerados ao analisar a síndrome metabólica, como o Índice de massa corporal (IMC) é um indicador de composição corporal para classificação do estado nutricional, Índice de Castelli (IC) que avalia o risco cardiovascular e o índice de resistência à insulina (HOMA-IR) que avalia a resistência à insulina.

Quadro 4: Índices metabólicos utilizados na avaliação dos grupos SM, OB/SB e Eutróficas.

IMC	Normal ≥ 18,5 a 24,9 kg/m ² Sobrepeso ≥ 25,0 a 29,9 kg/m ² Obeso > 30 kg/m ²
HOMA-IR	< 2,70
IC	<3,5

Fonte: (OMS, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, ARCANJO *et al.*, 2005)

Legenda: IMC - Índice de massa corporal; HOMA-IR - Índice de resistência a insula; IC- Índice de Castelli.

Um estudo transversal realizado analisando dados da população brasileira, obteve como resultado uma maior prevalência de síndrome metabólica (SM) na população feminina quando comparado a masculina. Os indivíduos com menor escolaridade e idade mais avançada também apresentaram uma maior prevalência de SM. Ainda no mesmo estudo foi obtida uma relação direta de presença de SM com altas medidas de circunferência da cintura e HDL baixo. (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

De acordo com WAMALA *et al.*, (1999) o nível de educação está associado a síndrome metabólica, seu estudo mostra que essa doença é mais prevalente em mulheres de meia-idade e com baixo grau de escolaridade. A alta correlação entre síndrome metabólica e mulheres no climatério associados aos riscos cardiovasculares e a mortalidade faz necessário o investimento em pesquisas nessa área.

Pesquisas vem associando a microbiota fecal a componentes da síndrome metabólica. De acordo com o metabolismo microbiano de lipídeos no intestino produzem produtos que podem levar ao desenvolvimento de aterosclerose, conhecido pelo acúmulo de gorduras, colesterol nas paredes das artérias (TANG *et al.*, 2013, WANG *et al.*, 2011). A hipertensão arterial é um dos componentes da síndrome metabólica, pesquisas indicam uma relação direta no microbioma intestinal e na regulação da pressão sanguínea (AHRÉN *et al.*, 2015; LYE *et al.*, 2009). Diante do efeito da microbioma intestinal na saúde do hospedeiro surgem estudos que envolvem a microbiota intestinal como alvo de terapias preventivas por exemplo como probióticos que melhoram a saúde gastrointestinal (LYE *et al.*, 2009; MAZIDI *et al.*, 2016).

3 HIPÓTESE

Mulheres classificadas como portadoras de síndrome metabólica e que estão no período do climatério possuem em sua microbiota intestinal maior quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* que pertence ao filo *Firmicutes* quando comparadas a mulheres obesas e com sobrepeso sem síndrome metabólica e mulheres eutróficas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Quantificar o filo *Firmicutes* e o gênero *Clostridium* em amostras fecais de mulheres em fase de climatério, a fim de avaliar se há mudanças no perfil dessa microbiota entre as fases pré-menopausa e pós-menopausa e na presença de síndrome metabólica.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as participantes do estudo conforme seus dados sociodemográficos a partir de entrevista.
- Quantificar o filo *Firmicutes* e o gênero *Clostridium* na microbiota intestinal utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR).
- Investigar e correlacionar os dados bioquímicos, hormonais e índices metabólicos com os dados da quantificação do filo *Firmicutes* e do gênero *Clostridium*.
- Investigar a relação entre o filo e o gênero analisado na presença de síndrome metabólica no climatério.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Foram recrutadas nessa pesquisa 37 mulheres residentes de Ouro Preto com idades entre 41 a 61 anos em fase de climatério que utilizavam o SUS e a rede privada de atendimento hospitalar na cidade. Essas mulheres foram classificadas em três grupos sendo eles: Síndrome Metabólica, Obeso/Sobrepeso sem síndrome metabólica e Eutróficas. Para classificação das mulheres em síndrome metabólica foi utilizada a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (Quadro 3). Essa Diretriz utiliza como parâmetros Circunferência abdominal, Triglicerídeos, HDL colesterol, Pressão arterial e Glicemia em jejum. Mulheres que apresentaram alterações em três desses parâmetros foram consideradas portadoras da síndrome metabólica. Além disso parâmetros de apoio, como Índice de Massa Corporal (IMC), HOMA-IR e Índice de Castelli (IC) também foram utilizados na definição de síndrome metabólica (Quadro 4). O Índice de Massa Corporal (IMC) também foi um componente empregado na definição de mulheres OB/SB e Eutróficas. As mulheres também foram classificadas conforme seu estágio de envelhecimento reprodutivo, em Pré-menopausa e Pós-menopausa. As participantes que foram incluídas na pesquisa apresentaram sintomas vasomotores, de origem geniturinários e ciclo menstrual alterado ou ausente devido ao climatério ou menopausa.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa envolvendo seres humanos (CEP/UFOP) sob o protocolo CAAE 29723420.9.0000.5150 (Anexo A). As integrantes desse estudo foram instruídas acerca da existência do protocolo e concordaram assinando o termo de consentimento Livre e esclarecido (TCLE) para serem inseridas no estudo. Todas as participantes foram entrevistadas, passaram por coleta de sangue para análises laboratoriais, além da coleta de fezes realizada por cada participante em sua residência sob orientação prévia.

5.2 Critérios de exclusão

Nesse estudo foram excluídas mulheres histerectomizadas, com câncer de mama e endométrio, casos de sangramento genital anormal de causa desconhecida após a menopausa, participantes com histórico de tromboembolismo e que possuíam diagnóstico de vaginoses no momento do recrutamento.

5.3 Coleta de fezes

A equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular forneceu kits contendo coletor de fezes, e revestimento estéril para o vaso sanitário para as pacientes realizarem a coleta das fezes em suas residências. Após colher esse material essas amostras foram entregues no posto de saúde e recolhida pelo grupo de pesquisa do LBBM, depois foram transportadas sob refrigeração para posterior análise.

5.4 Análise bioquímica

A coleta de sangue foi realizada no Laboratório piloto de Análises clínicas (LAPAC), onde as participantes seguiram a orientação para o jejum alimentar de 12 horas prévias. Esse material foi logo encaminhado para centrifugação, e obtido o soro para dosar os seguintes parâmetros bioquímicos: Perfil lipídico (CT, TG, HDL, VLDL, LDL), glicose, ureia, cálcio, creatinina, ácido úrico, apolipoproteína A (ApoA); apolipoproteína B (ApoB); lipoproteína (Lpa), e proteína C-reativa (PCR). Essas análises bioquímicas foram realizadas no analisador automatizado COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche). As dosagens hormonais realizadas foram: Beta Estradiol, Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio tireoestimulante (TSH), Insulina e Cortisol. De posse dos resultados foram analisados os índices metabólicos (índice de Castelli; HOMA; IMC).

5.5 Extração de DNA

As extrações de DNA fecal foram realizadas nas 37 amostras obtidas. Esse material genético foi extraído a partir de 15mg de fezes seguindo o protocolo International Human Microbiome Standard (IHMS/<http://www.microbiome-standards.org/>) sendo escolhido para uso o protocolo H com algumas adaptações (FOR; SAMPLES; EXTRACTION, 2015). Essas amostras foram acondicionadas em um freezer a -80°C. O processo de extração foi iniciado adicionando 250 µL de isotiocianato de guanidina (4M) seguido por adição de N-laurilSarcosina a 10% e 5% até o descongelamento total da amostra.

Amostras incubadas a 70°C por 60 minutos em termobloco, e adicionado 750 mg de *beads* de vidro com diâmetro de 0,1cm e homogeneizado com auxílio do vórtex. Posteriormente foi adicionado as amostras 10 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), amostras agitadas vigorosamente e centrifugadas a 9.000 x G por 5 minutos á 4°C. Adicionado 500 µL TENP

(tampão Tris-HCL, EDTA, NaCl e PVPP) realizada centrifugação a 9.000 x G por 10 minutos mantendo a temperatura de 4°C e coletado o sobrenadante em outro eppendorf. Após algumas repetições desse processo utilizando TENP o DNA foi precipitado com Isopropanol, centrifugado a 9.000 x G por 10 minutos, com descarte do sobrenadante. Adicionado tampão Phosphate e acetato de Potássio.

Amostras refrigeradas por uma hora e trinta minutos, seguido por centrifugação e recuperação do sobrenadante contendo DNA. Adicionado acetato de sódio e etanol a essas amostras que foram mantidas a -20°C por aproximadamente quinze horas. Amostras passaram por lavagens com etanol 70% e centrifugadas a 9.000 x G durante 5 minutos e por fim o DNA foi precipitado e ressuspendido.

O DNA extraído foi quantificado pelo método de espectrometria através do equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer® que também utiliza como indicador de qualidade e pureza da amostra a medida de absorbância pelo comprimento de onda A260/A280 nm, onde valores de razão entre 1,8 e 2,0 representam amostras com boa qualidade e sem contaminantes provenientes da extração. Em relação a avaliação da integridade do DNA extraído foi feito eletroforese do DNA genômico em gel de agarose na concentração 0,6% corado com Brometo de etídeo. Ao fim desse processo foi possível confirmar a integridade do DNA e excluir contaminação por RNA. A eletroforese foi realizada em condições de tampão TBE 0,5X a 80 volts de eletricidade e imagem obtida através do transiluminador UV.

5.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi padronizada a partir de 10 ng de DNA, foi utilizado o kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase- Promega. A programação utilizada no termociclador seguiu a ordem: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos: 95° C por 15 segundos / 60°C 15 segundos/ 72° C por 33 segundos e 1 ciclo de 72°C por 9 minutos. Após o final da reação de PCR foi feito o gel de agarose 1,2% para analisar o produto gerado. Os *Primers* utilizados nesse processo foram:

Quadro 5: Sequência de *primers* utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho pb</i>
Bactéria V3-V4	<i>Forward</i> (CCTACGGGNGGCWGCAG) <i>Reverse</i> (GACTACHVGGGTATCTAATCC)	444pb

<i>Firmicutes</i>	Forward (GGAGYATGTGGTTTAAATTCGAAGCA) Reverse (AGCTGACGACAACCATGCAC)	126pb
<i>Clostridium</i> sp	Forward (AAATGACGGTACCTGACTAA) Reverse (CTTGAGTTTCATTCTTGCGAA)	429pb

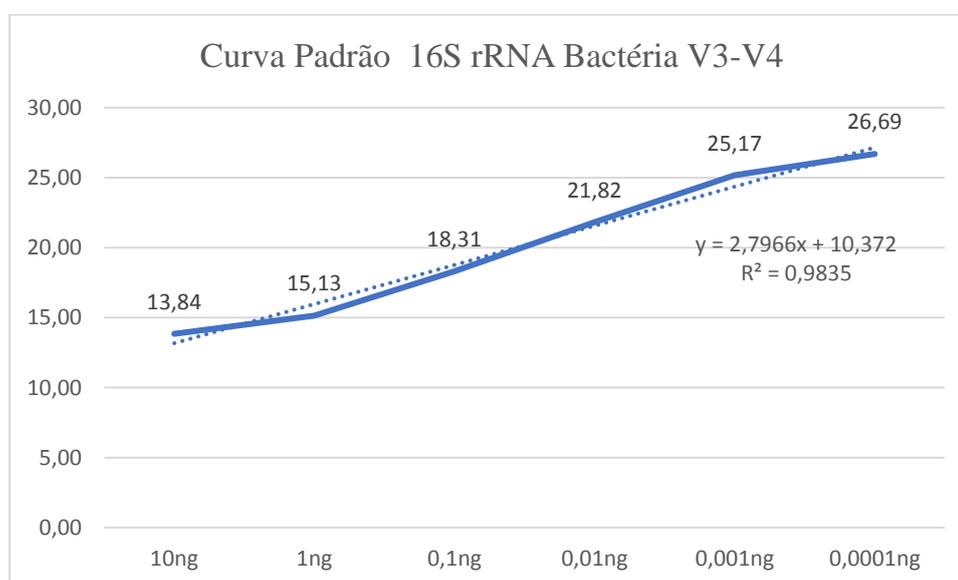
(JIAN *et al.*, 2020, BAHL; BERGSTRÖM; LICHT, 2012, JAMAR *et al.*, 2018)

5.7 Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)

A partir do DNA extraído foi produzida uma curva padrão utilizando o *Primer* Bactéria V3-V4. Nesse processo foram utilizadas placas de 96 poços que posteriormente foram seladas, nas reações foi utilizado o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix, sistema *Sybr Green* (*Applied Biosystems, Life Technologies*) e amostras reproduzidas em triplicata.

A partir dos valores obtidos com a curva padrão foi realizada a quantificação, na qual a reação utilizada para a qPCR teve um volume final de 10µL, sendo 4,9µL master mix, 0,1µL de CXR (corante de referência), 3µL de *primers*, na concentração de 10 mM, 1µL de água milliq estéril e 1µL DNA. Foram utilizados 6 pontos de diluição, com concentrações diferentes de DNA (10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 0,001ng e 0,0001ng). Todas as reações foram feitas em triplicatas e foi utilizado o aparelho *7300 Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*). A amplificação ocorreu nas respectivas temperaturas e tempos: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos referente a desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos pelo anelamento dos *primers* a 60 °C por 1 minuto, e extensão do fragmento de DNA desejado a 72 °C por 1 minuto.

Figura 3: Curva Padrão obtida a partir da amplificação de diferentes concentrações de DNA bacteriano utilizando *Primer* para as regiões hipervariáveis V3-V4



A partir da equação da reta obtida na curva padrão 16S rRNA Bactéria V3-V4 foi então calculado o número de cópias de DNA bacteriano para o filo *Firmicutes* e gênero *Clostridium*. Esse protocolo foi seguido para todas as 37 amostras utilizando 10ng de DNA, alternando apenas o *Primer* utilizado quantificando assim o filo e o gênero. A mesma fórmula foi utilizada para todas as amostras e foi obtido o número de cópias de DNA e sua correspondência em nanogramas, juntamente ao Ciclo Treshold (Ct) alcançado na amplificação.

Após o cálculo utilizando a equação da reta os valores obtidos foram aplicados a seguinte fórmula para obter o número de cópias de DNA bacteriano em cada amostra.

$$\text{Núm. cópias} = [\text{DNA (g/}\mu\text{L)} \times 6'022 \times 10^{23} \text{ (pb/mol)} / \text{lenght (pb)} \times 660 \text{ (g/mol)}]$$

Sendo que:

- DNA(g/ μ L) Concentração de DNA utilizado (10ng/ 1ng/ 0,1ng/ 0,001ng/ 0,0001ng/)
- Constante: $6'022 \times 10^{23}$
- DNA de referência: 4,600.00pb (DNA *E.coli*)
- Constante: 660 (g/mol)

5.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através do software *GraphPad Prism* versão 8.0.1. for Windows, (San Diego, CA, USA). Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para dados normais foi realizado teste One-way ANOVA e pós teste de Tukey, enquanto para dados não paramétricos foi utilizado teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Foram considerados como valores significativos quando $p \text{ value} < 0,05$. Foi correlacionado os parâmetros bioquímicos, hormonais e índices metabólicos com a quantificação do filo *Firmicutes* e *Clostridium*. Para os dados paramétricos foi utilizado correlação de Pearson e para os dados não paramétricos correlação de Spearman.

6 RESULTADOS

6.1 Dados sociodemográficos

A análise do perfil sociodemográfico traz informações sobre a composição de cada grupo. O grupo Síndrome metabólica (SM) (n=13) é composto por seis mulheres em pré menopausa e sete em pós menopausa onde a maioria possui idades entre 50-60 anos, com nenhuma escolaridade ou com primeiro grau. Ainda nesse grupo 83,33% das mulheres em pré menopausa possuíam companheiro enquanto 57% em pós menopausa não tinham companheiro. É possível observar um grande uso do SUS pelas mulheres desse grupo e a maior renda se concentra em 1-2 salários mínimos.

O grupo Obeso/Sobrepeso sem síndrome metabólica (OB/SB) (n=13) também houve um predomínio a idade de 50-60 anos e destaca um aumento de mulheres com escolaridade de 2º Grau a nível superior, há um predomínio de 2 e 3 filhos e a maior faixa de renda salarial se repete entre 1-2 salários-mínimos.

As mulheres classificadas como eutróficas (n=11) a faixa etária que se sobressaiu foi 55-60 anos, houve um destaque para o nível escolar pois nesse grupo 80% das mulheres em pré menopausa possuíam 2º Grau ou nível superior enquanto 50% das mulheres em pós-menopausa alegaram também essa escolaridade. Neste grupo considerando o total de mulheres (n=11) apenas 3 mulheres não possuíam nenhum filho.

Tabela 1: Perfil sociodemográfico referente aos grupos: Síndrome Metabólica, Obeso/Sobrepeso e grupo Eutróficas. Mantida a classificação de Pré menopausa e Pós-menopausa em cada grupo.

	Síndrome Metabólica		Obeso/Sobrepeso		Eutróficas	
	Pré (n=6)	Pós (n=7)	Pré (n=6)	Pós (n=7)	Pré (n=5)	Pós (n=6)
Faixa etária						
40-44	0	0	33,3%	0%	0 %	0%
45-49	50%	0	33,3%	0%	60 %	17%
50-54	50%	43%	33,3%	43%	40 %	17%
55-60	0	57%	0%	43%	0%	67%
61-65	0	0	0%	14%	0%	0%
Escolaridade						
Nenhuma/1º grau	66,67%	71%	33%	43%	20%	50%
2º Grau a superior	33,33%	29%	67%	57%	80%	50%

Estado Civil						
S/companheiro	16,67%	57%	50%	29%	20%	83%
C/companheiro	83,33%	43%	50%	71%	80%	17%
Nº Filhos						
0	0	14%	17%	0%	40%	17%
1	33,33%	14%	17%	14%	20%	33%
2	16,67%	29%	33%	43%	0%	17%
3	50%	14%	33%	14%	40%	33%
4 ou mais	0	29%	0%	29%	0%	0%
Sistema Saúde						
Público	100%	71%	67%	86%	60%	100%
Particular	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ambos	0%	29%	33%	14%	40%	0%
Renda mulher						
< 1 salário	33,33%	43%	33%	14%	40%	17%
1 salário	16,67%	43%	17%	29%	20%	50%
1 a 2 salários	50%	14%	33%	43%	20%	17%
3 a 5 salários	0%	0%	0%	0%	0%	0%
> 5 salários	0%	0%	17%	14%	20%	17%

Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Analitos bioquímicos

Foi constatada diferença significativa nos valores de triglicérides entre os grupos SM e OB/SB ($p=0,0055$) e SM e Eutróficas ($p=0,0389$). Níveis de glicose, e VLDL também demonstraram diferenças significativas quando comparados SM versus OB/SB e SM versus Eutróficas. Valores de HDL apresentaram diferença entre os grupos SM versus OB/SB ($p=0,0180$). Observada diferença estatística significativa no ácido úrico entre os grupos SM e Eutróficas ($p=0,0290$). Por fim a PCR também se apresentou diferente entre os grupos SM versus Eutróficas ($p<0,0001$). Valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Análises bioquímicas para os grupos Síndrome metabólica, Obeso/Sobrepeso e Eutróficas.

Analitos (mg/dL)	1) Síndrome Metabólica	2) Obeso/Sobrepeso	3) Eutróficas	P value (1-2)	P value (2-3)	P value (1-3)
	Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP (n= 13)	Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP (n=13)	Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP (n= 11)			
CT	242,2± 50,96	212,7± 48,3	212,6 ± 35,8	0,2462	>0,9999	0,2741
TG	151,0 (109,0 - 279,5)	96,0 (54,0 - 120,0)	107,0 (79,0 - 117,0)	0,0055*	>0,9999	0,0389*
Glicose	110,0 (102,5-141,5)	94,0 (81,0 - 97,0)	88,0 (85,0 - 96,0)	0,0054*	>0,9999	0,0085*
HDL	48,00 (44 – 51,50)	61,00 (52,50 – 67,00)	62,00 (49,0-75,0)	0,0180*	>0,9999	0,0560
LDL	154,0 (132,0-175,0)	147,0 (106,5 - 161,5)	138,0 (91,0 - 162,0)	0,9045	>0,9999	0,8823
VLDL	30,0 (22,0 – 55,5)	19,0 (10,5 - 24,0)	21,0 (16,0 - 23,0)	0,0065*	>0,9999	0,0449*

Ureia	31,08 ± 10,07	29,31±8,43	30,09 ± 10,85	0,9561	0,9627	0,9627
Cálcio	9,66 ± 0,33	9,58 ± 0,32	9,68 ± 0,47	0,8344	0,7754	0,9905
Creatinina	0,72 ± 0,10	0,77 ± 0,088	0,79 ± 0,083	0,4464	0,8384	0,2026
Ácido Úrico	5,68 ± 1,67	4,83 ± 0,84	4,21 ± 1,33	0,2536	0,4947	0,0290*
ApoA	166,0 ± 18,75	170,2 ± 26,65	172 ± 26,03	0,8946	0,9823	0,8150
ApoB	138,9 ± 39,37	111,6 ± 28,67	108,9 ± 24,68	0,0885	0,9766	0,0697
Lpa	13,60 (5,00 - 40,45)	19,70 (10,95 - 38,25)	20,9 (13,20 - 40,30)	>0,9999	>0,9999	>0,9999
PCR	6,83 (3,28 - 13,85)	2,76 (1,51 - 5,65)	1,12 (0,82 - 1,28)	0,1116	0,0872	<0,0001*

SM (n= 13); Obeso/Sobrepeso (n=13); Eutróficas (n=11); HDL= lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa; ApoA= apolipoproteína A; ApoB= apolipoproteína B; Lpa= lipoproteína, PCR= proteína C- reativa. Dados normais expressos em média ± desvio padrão (M ± DP) e dados não paramétricos mostrados como mediana (máx- mín). Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para dados normais realizado teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey enquanto para dados não paramétricos utilizado teste Kruskal Wallis. Significância considerada quando p valor <0,05.

6.3 Analitos hormonais

Em relação a dosagens hormonais foi verificado que apenas a insulina apresentou diferenças significativas entre o grupo SM e obeso/sobrepeso (p=0,0009), e SM quando comparado a Eutróficas (p= 0,0001).

Tabela 3: Análises hormonais para os grupos SM, OB/SB e Eutróficas.

Analitos	1) Síndrome Metabólica (n= 13) Mediana;1° - 3° Quartis ou Média±DP	2) Obeso/Sobrepeso (n=13) Mediana;1° - 3° Quartis ou Média±DP	3) Eutróficas (n= 11) Mediana;1° - 3° Quartis ou Média±DP	P value (1-2)	P value (2-3)	P value (1-3)
Beta-estradiol (pico/dL)	28,29 (15,96 - 51,24)	15,39 (10,96 - 43,80)	15,02 (6,04 - 51,30)	0,4416	>0,9999	0,3498
FSH (mUI/dL)	34,55 ± 23,44	32,93 ± 26,58	42,05 ± 33,51	0,9879	0,7050	0,7888
LH (mUI/dL)	30,69 ± 18,54	27,57 ± 19,85	33,32 ± 20,35	0,9132	0,7546	0,9422
TSH (microUI/dL)	2,54 (1,69 - 3,73)	2,31 (1,58 - 4,01)	2,60 (1,22 - 4,85)	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Insulina (um/L)	13,84 ± 7,44	6,27 ± 2,41	4,49 ± 2,19	0,0009*	0,6438	0,0001*
Cortisol (mcg/dL)	15,04 ± 7,29	17,01 ± 9,19	17,79 ± 6,18	0,7755	0,8072	0,7755

SM (n= 13); Obeso/Sobrepeso (n=13); Eutróficas (n=11); Dados normais expressos em média ± desvio padrão (M ± DP) Dados não paramétricos mostrados mediana (máx – mín). Realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para dados normais realizado teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey enquanto para dados não paramétricos utilizado teste Kruskal Wallis. FSH = Hormônio Folículo estimulante; LH= Hormônio Luteinizante; TSH= Hormônio Tireoestimulante. Significância considerada quando p valor<0,05.

6.4 Índices metabólicos

Em relação aos índices metabólicos foi encontrada diferença entre SM e OB/SB ($p=0,0288$) e SM e Eutróficas ($p=0,0441$). Já o HOMA-IR mostrou-se diferente entre SM e OB/SB ($p<0,0001$) e SM comparada a Eutróficas ($p<0,0001$) como mostrado na Tabela 4. O IMC foi diferente entre o grupo OB/SB comparado a Eutróficas ($p=0,0005$) e quando comparado SM a Eutróficas ($p<0,0001$).

Tabela 4: Índices metabólicos para os grupos Síndrome metabólica, Obeso/Sobrepeso e Eutróficas.

	1) SM (n= 13) Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	2) Ob/Sb (n=13) Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	3) Eu (n= 11) Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	P value (1-2)	P value (2-3)	P value (1-3)
IC	3,19 ± 0,98	2,29 ± 0,68	2,32 ± 0,86	0,0288*	0,9973	0,0441*
HOMA (IR)	4,15 ± 2,3	1,44 ± 0,55	1,0 ± 0,49	<0,0001*	0,7389	<0,0001*
IMC	34,04 (28,56- 42,28)	31,05 (29,52 - 32,45)	22,68 (19,27 - 23,60)	>0,9999	0,0005*	<0,0001*

SM (Síndrome Metabólica n=13); Ob/Sb (Obeso/Sobrepeso n=13); Eu (Eutróficas n=11); IC = Índice de Castelli; HOMA (IR) = *Homeostatic Model Assessment (Insulin Resistance)*; IMC = Índice de massa corporal. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para dados normais realizado teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey, enquanto para dados não paramétricos utilizado teste Kruskal Wallis. Significância considerada quando p valor <0,05.

6.5 Avaliação do DNA extraído

O DNA das 37 amostras foi extraído e quantificado pelo método de espectrometria através do equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer® que também utiliza como indicador de qualidade e pureza da amostra a medida de absorvância pelo comprimento de onda A260/A280 nm, onde valores de razão entre 1,8 e 2,0 representam amostras com boa qualidade e sem contaminantes provenientes da extração. A Tabela 5 exemplifica algumas amostras que foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 5: Avaliação da qualidade e pureza do DNAg extraído das amostras fecais.

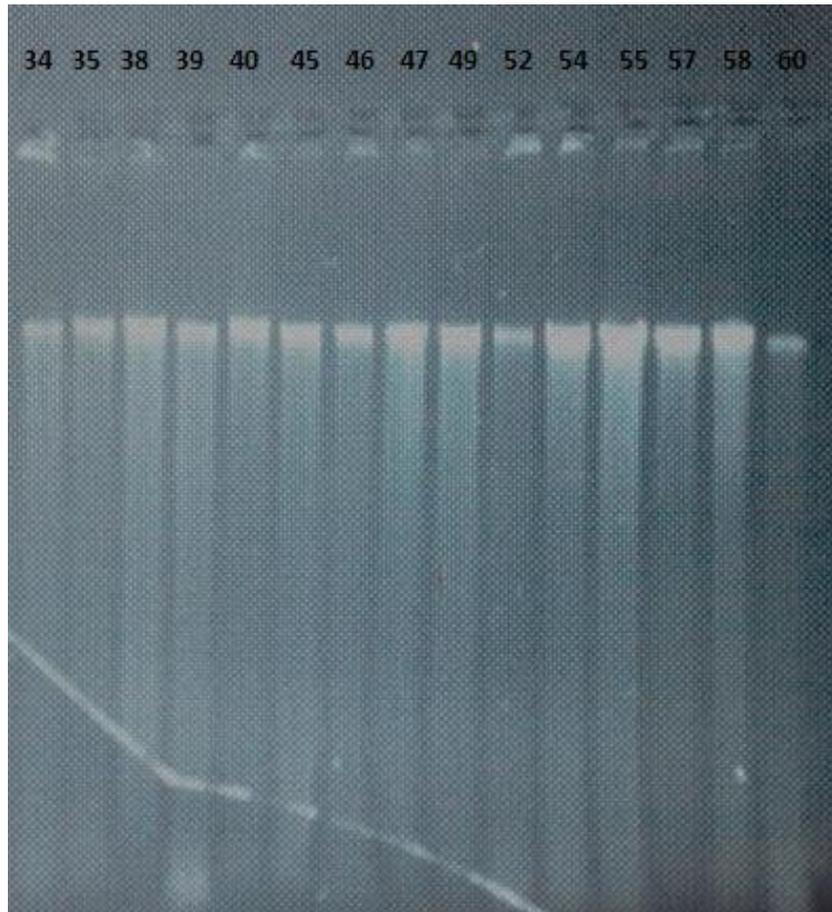
Amostra	A260/A280
M34	1,81
M35	1,92
M38	1,84
M39	2,0
M40	1,96
M45	1,82
M46	1,94
M47	1,82
M49	1,80
M52	1,87
M54	1,85
M55	2,0
M57	1,95
M58	1,80
M60	1,82

Elaborado pelo autor

Legenda: Todas as 37 amostras foram avaliadas utilizando o Nanodrop, 1uL de cada amostra foi utilizado para a avaliação da qualidade e quantidade utilizando o equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer®. Para uma melhor explicação apenas 15 amostras são mostradas na Tabela 5.

Também utilizamos como critério para verificar a qualidade das extrações a análise em gel de agarose. Como pode ser observado na figura 4, que é representativa das 37 amostras desse estudo, o protocolo utilizado para extração de DNAg das amostras se mostrou eficiente. É possível observar na Figura 4 a presença de uma banda íntegra de DNAg representando cada amostra que foi utilizada para extração.

Figura 4: Análise feita por meio da técnica de eletroforese em gel para avaliar da integridade do DNAg extraído de amostras fecais.



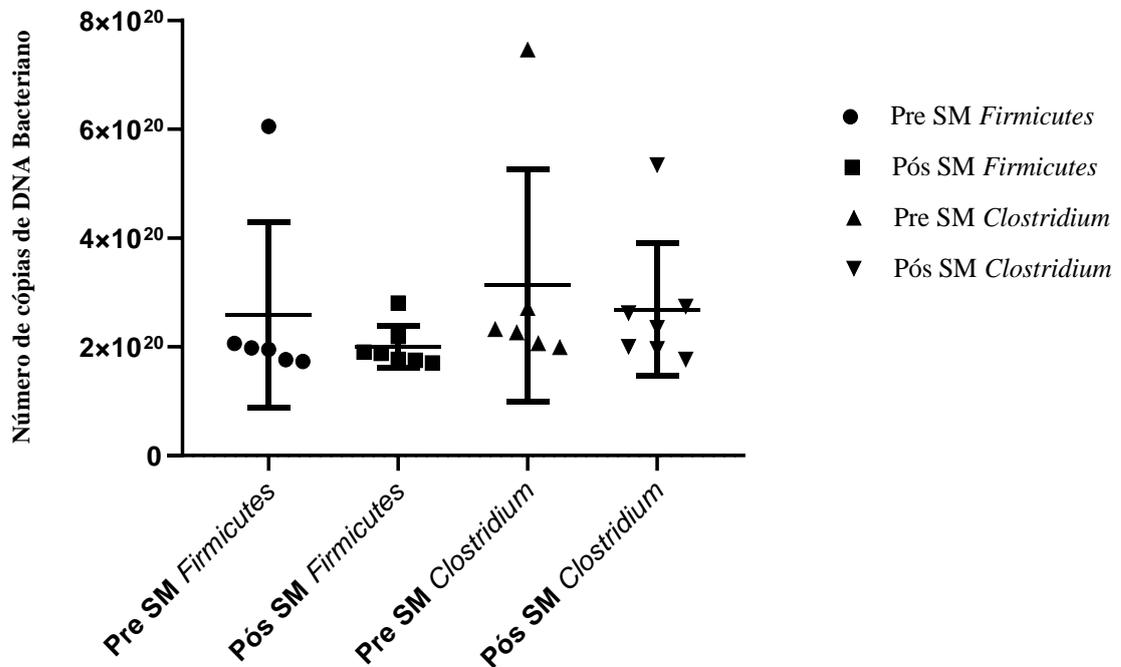
Foram aplicados 80ng de DNAg para avaliação por eletroforese em gel de agarose 0,6% em TBE 0,5x e corado com Brometo de etídeo. Fotodocumentado através de transiluminador.

6.6 Quantificação do filo *Firmicutes* e gênero *Clostridium* por metodologia de qPCR

Foram avaliados o filo *Firmicutes* e o gênero *Clostridium* na microbiota intestinal através de amostras fecais. De posse dos resultados da quantificação inicialmente foi realizada a análise comparativa com o número de cópias de DNA bacteriano do filo *Firmicutes* e do gênero *Clostridium* em cada grupo SM, OB/SB e Eutróficas mostrando as fases reprodutivas dentro de cada grupo.

Figura 5: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* e *Clostridium* no grupo mulheres com síndrome metabólica (SM) entre as fases reprodutivas.

qPCR grupo SM (Pré-menopausa x Pós-menopausa)

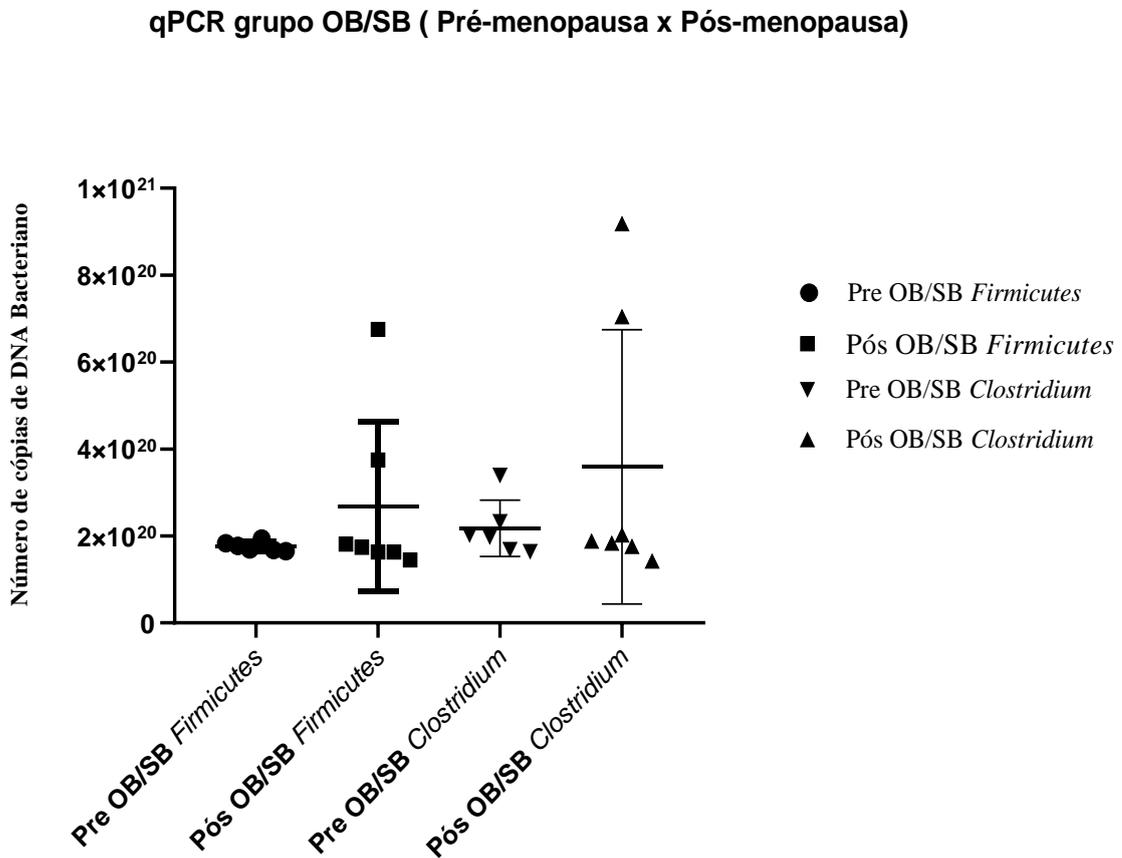


Fonte: Elaboração Própria

Realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk entre os dados, e para os dados não paramétricos feito o teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Dados não paramétricos, são mostrados com mediana (máximo – mínimo). Grupo SM: 13, pré-menopausa: 6; pós-menopausa: 7. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada mg de fezes.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os estágios de envelhecimento reprodutivo tanto para filo quanto para gênero nesse grupo SM. Entretanto considerando a mediana as mulheres em pré menopausa apresentaram maior número de cópias ($1,96 \times 10^{20}$) para o filo *Firmicutes*. Avaliando o mesmo parâmetro de mediana em relação ao gênero *Clostridium* mulheres em pós-menopausa mostraram abrigar maior número de cópias ($2,35 \times 10^{20}$).

Figura 6: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* e *Clostridium* no grupo mulheres Obesas e com Sobrepeso sem síndrome metabólica (OB/SB) entre as fases reprodutivas.

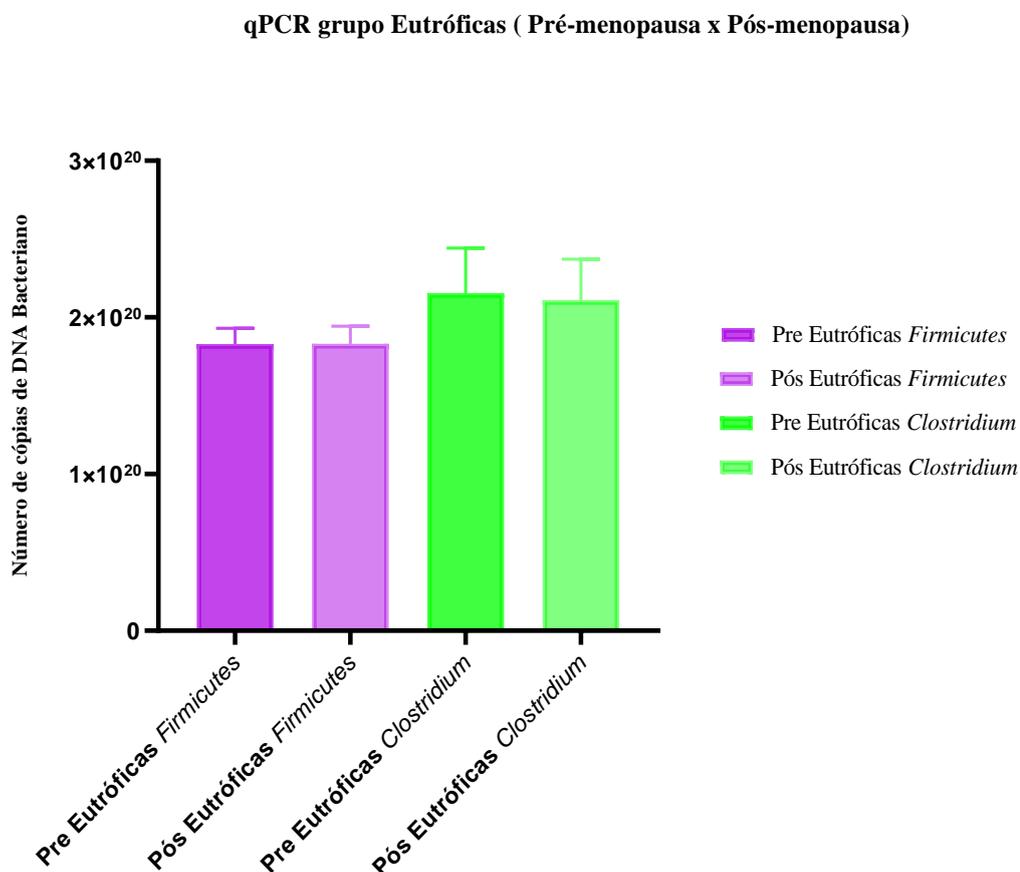


Fonte: Elaboração Própria

Realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk entre os dados, e para os dados não paramétricos feito o teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Dados não paramétricos, são mostrados com mediana (máximo – mínimo). Grupo OB/SB: 13, pré-menopausa: 6, pós-menopausa:7. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada mg de fezes.

Ao avaliar o grupo OB/SB não houve diferença estatística entre as fases pré e pós-menopausa tanto para filo quanto para o gênero avaliado. Ao analisar o filo *Firmicutes* o maior número de cópias de DNA bacteriano foi encontrado em mulheres em pós-menopausa indicado pela mediana (1,74x10²⁰). O gênero *Clostridium* apresentou-se destacado em pré-menopausa (2,00x10²⁰).

Figura 7: Quantificação do número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* e *Clostridium* no grupo de mulheres Eutróficas entre as fases reprodutivas.



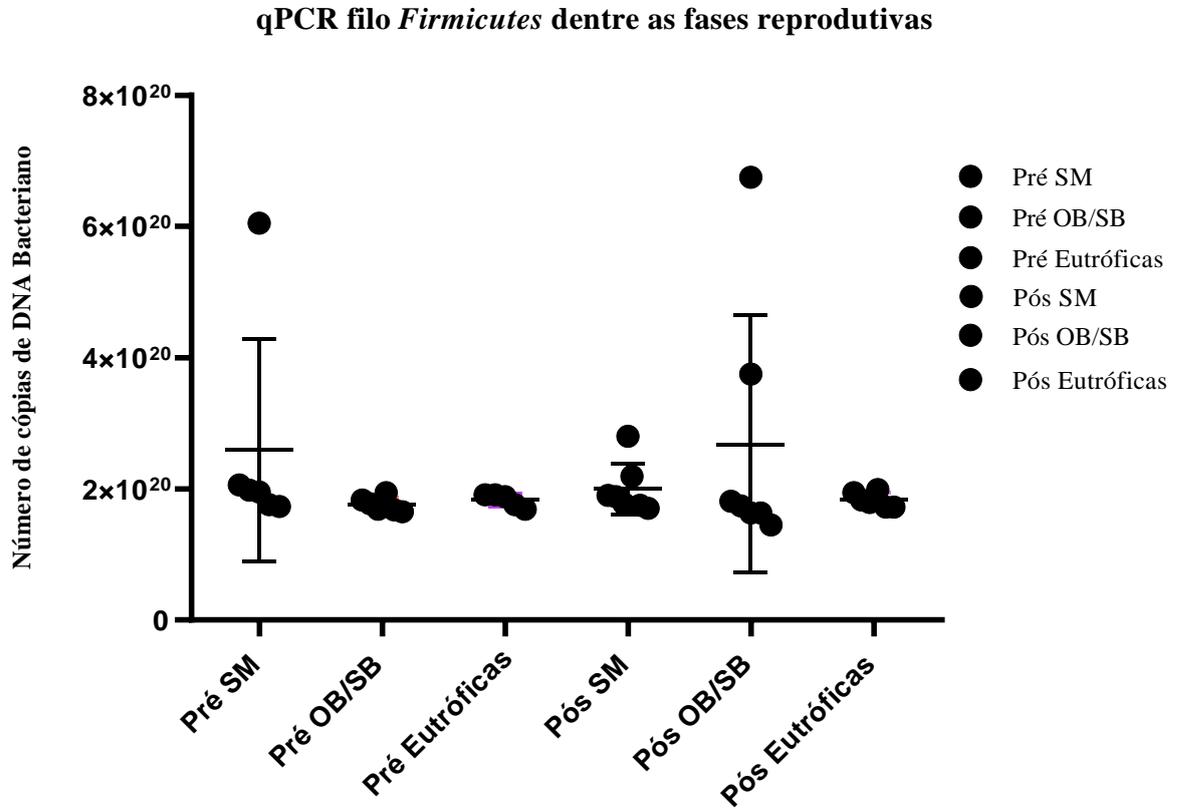
Fonte: Elaboração Própria

Realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk entre os dados. Dados paramétricos, realizado teste One-way ANOVA com pós teste de Tukey. Dados normais são mostrados com média e desvio padrão. Eutróficas: 11, pré-menopausa: 5, pós-menopausa: 6. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada mg de fezes.

Para o grupo de mulheres classificadas como Eutróficas, não foram visualizadas diferenças significativas em relação ao número de cópias de DNA para o filo *Firmicutes* e para o gênero *Clostridium*. Avaliando a média entre os estágios mulheres em pós-menopausa apresentaram maiores valores para o filo *Firmicutes* ($1,83 \times 10^{20}$). Mulheres eutróficas em pré menopausa apresentaram maiores níveis de *Clostridium* ($2,15 \times 10^{20}$).

Posteriormente realizou-se uma análise comparativa para os níveis encontrados para o filo e para o gênero, entre os três grupos e suas respectivas fases de envelhecimento.

Figura 8: Análise comparativa do número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* entre os estágios de envelhecimento reprodutivo.

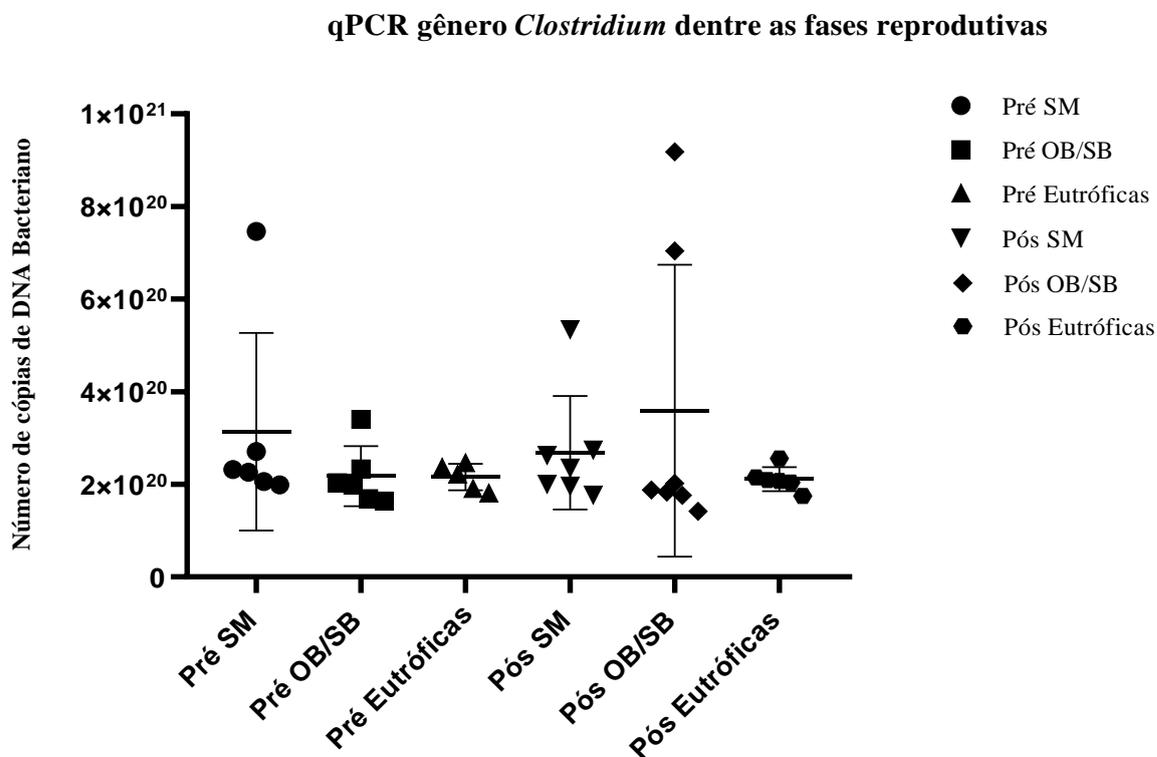


Fonte: Elaboração Própria

Realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk e para os dados não paramétricos feito o teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Pré SM :6, Pré OB/SB:6; Pré Eutróficas:5, Pós SM:7, Pós OB/SB 7, Pós Eutróficas:6. Dados analisados como não paramétricos. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada mg de fezes.

Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa em relação ao número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* entre as fases de envelhecimento reprodutivo nos grupos analisados. Porém mulheres portadoras de Síndrome metabólica em pré menopausa apresentaram maiores valores de mediana para o filo *Firmicutes* ($1,965 \times 10^{20}$), enquanto o grupo OB/SB apresentou menor número de cópias ($1,730 \times 10^{20}$) na mesma fase reprodutiva. Foi verificado que mesmo em fase de pós-menopausa o grupo SM manteve-se apresentando maior número de cópias de DNA referente ao filo *Firmicutes* ($1,880 \times 10^{20}$).

Figura 9: Análise comparativa do número de cópias de DNA bacteriano de *Clostridium* entre os estágios de envelhecimento reprodutivo e entre os grupos.



Realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk entre os dados, e para os dados não paramétricos feito o teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Pré SM:6, Pré OB/SB:6; Pré Eutróficas:5, Pós SM 7, Pós OB/SB:7, Pós Eutróficas:6. Dados analisados como não paramétricos. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada mg de fezes.

Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa para o gênero *Clostridium* entre as fases de envelhecimento reprodutivo nos grupos. Avaliando pelos valores de mediana foi observado que em pré menopausa o grupo SM apresentou maior número de cópias de DNA para *Clostridium* ($2,29 \times 10^{20}$) enquanto o grupo OB/SB manteve um número menor ($2,00 \times 10^{20}$). Quando avaliado a pós-menopausa o resultado foi semelhante pois o grupo SM também mostrou maior número de cópias de DNA para *Clostridium* ($2,35 \times 10^{20}$), enquanto no grupo OB/SB manteve-se o menor número de cópias ($1,88 \times 10^{20}$).

6.7 Correlações para o filo *Firmicutes* e gênero *Clostridium* com os parâmetros bioquímicos, hormonais e metabólicos.

Foi realizada a análise buscando possíveis correlações entre os níveis de *Firmicutes* e *Clostridium* com as dosagens bioquímicas e hormonais nos grupos deste estudo. Dados apresentados na tabela 6. Foi encontrada uma relação significativa entre o filo *Firmicutes*, o gênero *Clostridium* em mulheres do grupo SM com os níveis de cálcio. Outra correlação encontrada no mesmo grupo foi em relação aos níveis de LH. Mulheres do grupo Eutróficas apresentaram correlação significativa entre o filo *Firmicutes* e hormônio TSH.

Tabela 6: Correlações entre níveis de *Firmicutes* e *Clostridium* nos grupos SM, OB/SB e Eutróficas com variáveis bioquímicas e hormonais.

Síndrome Metabólica <i>Firmicutes</i>	CT 0,249	TG 0,137	Glic 0,054	HDL 0,063	LDL 0,129	VLDL -0,137	Ureia 0,059	Cálcio 0,726*	Crea -0,260	Au 0,535
	ApoA 0,326	ApoB 0,311	Lpa 0,324	PCR -0,269	Estr 0,055	FSH 0,245	LH 0,717*	TSH -0,299	Insulina -0,347	Cortisol 0,148
Síndrome Metabólica <i>Clostridium</i>	CT 0,123	TG -0,428	Glic 0,060	HDL 0,227	LDL 0,088	VLDL -0,428	Ureia -0,064	Cálcio 0,601*	Crea -0,380	Au 0,412
	ApoA 0,101	ApoB 0,224	Lpa 0,082	PCR -0,324	Estr -0,07	FSH 0,236	LH 0,589*	TSH -0,252	Insulina -0,324	Cortisol 0,195
OB/SB	CT 0,157	TG 0,174	Glic -0,02	HDL -0,136	LDL 0,201	VLDL 0,120	Ureia 0,335	Cálcio 0,484	Crea 0,215	Au 0,130

<i>Firmicutes</i>	ApoA 0,113	ApoB 0,171	Lpa 0,007	PCR -0,148	Estr 0,049	FSH 0,186	LH 0,221	TSH 0,264	Insulina -0,298	Cortisol 0,0983
OB/SB <i>Clostridium</i>	CT 0,144	TG 0,072	Glic -0,08	HDL -0,081	LDL 0,18	VLDL 0,028	Ureia 0,433	Cálcio 0,506	Crea 0,243	Au 0,070
	ApoA 0,171	ApoB 0,151	Lpa 0,016	PCR -0,112	Estr 0,021	FSH 0,100	LH 0,157	TSH 0,263	Insulina -0,255	Cortisol 0,066
Eutróficas <i>Firmicutes</i>	CT 0,297	TG 0,406	Glico 0,106	HDL 0,363	LDL 0,059	VLDL 0,449	Ureia 0,339	Cálcio 0,071	Crea 0,213	Au 0,334
	ApoA 0,405	ApoB 0,077	Lpa -0,44	PCR -0,350	Estr 0,022	FSH 0,130	LH 0,232	TSH 0,671*	Insulina -0,157	Cortisol -0,2513
Eutróficas <i>Clostridium</i>	CT -0,173	TG -0,263	Glic 0,265	HDL 0,353	LDL -0,18	VLDL -0,255	Ureia 0,311	Cálcio -0,166	Crea -0,270	Au 0,034
	ApoA 0,381	ApoB -0,260	Lpa -0,24	PCR -0,346	Estr 0,309	FSH -0,039	LH -0,024	TSH 0,481	Insulina -0,040	Cortisol -0,093

Legenda: CT= colesterol total; TG= triglicerídeos; Glic= glicose; HDL= lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa; Crea = creatinina; Au= ácido úrico; ApoA= apolipoproteína A; ApoB= apolipoproteína B; Lpa= lipoproteína, PCR= proteína C- reativa, Est= beta-estradiol. Para os dados paramétricos foi feita a correlação de Pearson e para os dados não paramétricos a correlação de Spearman. *Correlação de Pearson: Grupo SM: *Firmicutes* e cálcio; p=0,0049 e *Firmicutes* e LH; p=0,0058; *Clostridium* e cálcio; p= 0,0295 e *Clostridium* e LH; p=0,0340; Grupos Eutróficas: *Firmicutes* e TSH; p= 0,0237.

Tabela 7: Correlações entre níveis de *Firmicutes* e *Clostridium* nos grupos SM, OB/SB e Eutróficas com variáveis metabólicas.

GRUPO	IC	HOMA-IR	IMC
Síndrome metabólica <i>Firmicutes</i>	-0,03823	-0,3029	-0,2221
Síndrome metabólica <i>Clostridium</i>	0,001517	-0,2701	-0,2338
Obeso/Sobrepeso <i>Firmicutes</i>	0,2755	-0,3051	-0,1574
Obeso/Sobrepeso <i>Clostridium</i>	0,2095	-0,2741	-0,2058
Eutróficas <i>Firmicutes</i>	-0,1325	-0,1413	-0,4018
Eutróficas <i>Clostridium</i>	-0,3913	-0,02418	0,1000

Legenda: Para os dados paramétricos realizada a correlação de Pearson e para os dados não paramétricos a correlação de Spearman. IC: Índice de Castelli; HOMA-IR: Resistência à insulina; IMC: Índice de Massa Corporal.

Não foram observadas nenhuma correlação significativa entre os três grupos (SM, OB/SB e Eutróficas) e as variáveis metabólicas.

7 DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida mais mulheres estão vivenciando o período do climatério e seus efeitos bioquímicos, hormonais, metabólicos e psicossociais (IBGE, 2010; BRASIL, OMS, 2018, BRASIL, 2008). Estudos como o de Gaspard; Gottal; Van Den Brûle (1995) fazem uma associação direta com mulheres que estão na transição menopausal e o fato de essas terem mais chances de desenvolver a síndrome metabólica. Outro fator importante e que está relacionado a essa fase é a microbiota intestinal, esse ambiente é dinâmico e pode ser alterado por diversos fatores influenciando diretamente nas condições de saúde e doenças nos seres humanos (KOREN *et al.*, 2012, PÉREZ-COBAS *et al.*, 2013).

Foram obtidos resultados neste estudo que indicaram que a maioria das mulheres que foram identificadas como portadoras de síndrome metabólica no climatério não tinha nenhuma escolaridade ou estudaram apenas até o primeiro grau do ensino médio. A maior parte dessas mulheres com esse grau de instrução encontravam-se na fase de pós-menopausa (Tabela 1). Em contrapartida os resultados referentes ao grupo de mulheres Eutróficas em pré menopausa mostram que 80% possuem segundo grau completo. No grupo Obeso/ Sobrepeso sem síndrome metabólica encontramos 67% de mulheres pré menopausadas com segundo grau (Tabela 1).

Um estudo realizado por WAMALA *et al.*, (1999) na Suécia, com mulheres na faixa etária de 30 a 65 anos, teve como resultado que a baixa escolaridade se associa com o aumento de risco de síndrome metabólica em mulheres de meia-idade. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com o estudo na Suécia, pois como mostrado anteriormente mulheres portadoras de SM foram as que apresentaram o menor nível de escolaridade (Tabela 1).

Outro estudo realizado na região Sul do Brasil, com 236 mulheres em estado menopausal, foi demonstrado que uma maior escolaridade estava associada ao grupo de pré-menopausa, enquanto no grupo de pós-menopausa foi observado uma maior prevalência de comorbidades, sobrepeso e obesidade (DE LORENZI *et al.*, 2009). Os resultados obtidos avaliando as 37 mulheres na cidade de Ouro Preto, indicaram que as mulheres com menor grau de instrução possuíam a condição de Síndrome metabólica, o que pode sugerir uma relação entre essa baixa escolaridade e o risco de desenvolver SM, obesidade e ou sobrepeso. Isso pode ser explicado pelo fato de que um maior nível de escolaridade possa trazer conhecimentos e maiores cuidados com a saúde de forma geral.

Avaliando então o grupo de mulheres eutróficas, elas apresentaram maior grau de escolaridade e apresentaram maior número de mulheres sem filhos, fato que também pode estar relacionado a uma maior alfabetização. De acordo com HAIDAR; OLIVEIRA;

NASCIMENTO (2001) em um estudo realizado em São Paulo, Brasil, mulheres com menor escolaridade tem uma maior quantidade de filhos quando comparadas as mulheres com maior escolaridade. O estudo ainda atribui esse achado a falta de informação, e a falta de acesso a serviços de saúde por parte das mulheres com menor grau de alfabetização.

Em relação aos resultados das análises bioquímicas o grupo SM apresentou valores medianos de 151 mg/dL para triglicerídeos, esse valor é considerado acima dos parâmetros e componentes recomendados pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III). O grupo de mulheres com SM apresentou maiores níveis de VLDL em relação aos demais grupos e isso foi significativo. Avaliando também a lipoproteína de alta densidade (HDL) esse analito se mostrou diminuído no grupo SM em relação ao grupo OB/SB com uma diferença significativa (Tabela 2). De acordo com FONSECA *et al.*, (2019) a redução acentuada na produção de estrogênio após a menopausa contribui para a disfunção endotelial e distúrbios no perfil lipídico. Junto a isso uma maior prevalência de síndrome metabólica vem sendo associada ao período de pós-menopausa (LAMISSE, 2009).

Altos índices de triglicerídeo, VLDL, LDL, além de uma diminuição do colesterol HDL vem se associando a mulheres no climatério e com síndrome metabólica, caracterizando um perfil mais aterogênico (FONSECA *et al.*, 2019, Gaspard; Gottal; Van Den Brûle.,1995). Ainda em relação a bioquímica (Tabela 2), foi observado diferença significativa na proteína C reativa (PCR) no grupo de SM versus Eutróficas ($p < 0,0001$), já o analito glicose ocorreu diferenças significativas entre os grupos SM versus OB/SB ($p = 0,0054$) e SM versus Eutróficas ($p = 0,0085$). Por fim o analito ácido úrico que apresentou diferença significativa entre mulheres com SM versus mulheres Eutróficas ($p = 0,0290$).

A proteína C reativa é liberada pelo fígado sob a estimulação de citocinas como TNF- α e interleucina-6, essa proteína é conhecida como marcadora de inflamação (OKOSUN, 2008, (CASTELL *et al.*, 1990). O tecido adiposo contribui para a liberação e produção de citocinas (MCGOWN; BIRERDINC; YOUNOSSI, 2014), sugerindo uma relação entre um maior acúmulo de gordura com aumento desse marcador inflamatório no sangue. Nossos resultados corroboram com um estudo realizado na Tailândia que observou maiores concentrações de PCR em mulheres com síndrome metabólica quando comparadas aquelas sem SM (HILLMAN *et al.*, 2010). Além disso, estudos sugerem a relação entre fatores inflamatórios, resistência a insulina e síndrome metabólica (NASH, 2005, YUDKIN *et al.*, 1999) fazendo uma associação que indivíduos com síndrome metabólica possuem uma glicose mais elevada do que indivíduos eutróficos. Além disso dentre os critérios utilizados nesse trabalho para definir a presença de síndrome metabólica, a glicose em jejum elevada ≥ 110 mg/dL é parâmetro característico dos

indivíduos que possuem esse transtorno.

Como dito anteriormente a taxa de prevalência de síndrome metabólica aumenta para mulheres no climatério (de Gaspard; Gottal; Van Den Brûle ; 1995), nessa fase também ocorre a queda de estrogênio, hormônio esse que reduz os níveis de ácido úrico no sangue (NICHOLLS; SNAITH; SCOTT, 1973, SUMINO *et al.*, 1999). Existem estudos que relacionam o aumento do AU ao período de menopausa (WINGROVE; WALTON; STEVENSON, 1998) e pesquisas que relacionam o aumento de AU a mulheres com síndrome metabólica independente do estado de menopausa (JOO *et al.*, 2014).

Todos os dados desse estudo que se referem a insulina, seja nos analitos bioquímicos (glicose), hormonais (insulina) ou nos índices metabólicos (HOMA-IR) apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos SM versus OB/SB e SM versus Eutróficas (Tabela 2,3 e 4), isso ocorre, pois, grande parte dos indivíduos com síndrome metabólica possuem glicose elevada, chegando a ter valores tão altos que geram resistência à insulina. Por isso a resistência à insulina é comumente relacionada a síndrome metabólica (NASH, 2005, YUDKIN *et al.*, 1999).

Em relação aos outros índices metabólicos (Tabela 4), o Índice de Castelli (IC) que avalia o risco cardiovascular mostrou diferença significativa entre os grupos de mulheres com síndrome metabólica versus OB/SB e entre as mulheres com SM versus mulheres Eutróficas. A síndrome metabólica se caracteriza por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, entre esses fatores podemos citar a lipoproteína de alta densidade (HDL), que é usado para o cálculo do IC-I (Colesterol total/ HDL). Um estudo realizado por GORDON *et al.*, (1977), sugere uma relação direta com a baixa do HDL e o aumento do risco cardiovascular. O mesmo ocorre para o colesterol total, grandes quantidades desse analito pode formar placas que obstruem a passagem de sangue no coração provocando infarto.

Já o índice de massa corporal (IMC) é um indicador de composição corporal para classificação do estado nutricional, é calculado dividindo o peso (em kg) pela altura ao quadrado (em metros). Os parâmetros recomendados pela OMS, estão no (Quadro 3). Esse índice metabólico mostrou diferença significativa entre os grupos OB/SB versus Eutróficas e SM versus Eutróficas (Tabela 4). Além da I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, o IMC foi utilizado para dividir as mulheres em grupos nesse estudo. Sendo que o grupo com SM apresentou a maior mediana de IMC (34,04), dados esse que corroboram com uma pesquisa realizada no sul do Brasil (FOGAÇA *et al.*, 2019). De acordo com os resultados dessa pesquisa quanto maior o IMC maior é a ocorrência de síndrome metabólica. Além disso observando o aumento do IMC do grupo de mulheres com SM, notou-

se que nesse mesmo grupo também ocorreu uma elevação nos níveis de triglicerídeos, da glicose em jejum e uma redução dos níveis do colesterol HDL, resultados esse que foram descritos por REZENDE *et al.*, (2006).

Avaliando então a microbiota intestinal das 37 participantes foi feito a extração do DNA fecal e, foi utilizado a técnica de eletroforese em gel de agarose (Figura 4), técnica essa que é a mais utilizada na Biologia Molecular para avaliar a integridade e pureza do DNA (KIRKPATRICK, 1991). Através do gel de agarose, as moléculas de DNA migram e a velocidade dessa migração é definida pelo tamanho do DNA, concentração de agarose, conformação do DNA, voltagem que é utilizada, buffer de eletroforese e tipo de matriz (LEE *et al.*, 2012).

Outra técnica de Biologia Molecular utilizada nesse estudo foi a qPCR, utilizada para fazer uma quantificação do filo *Firmicutes* e do gênero *Clostridium* na microbiota intestinal dos grupos de mulheres dessa pesquisa (SM, OB/SB e EU) demonstrando assim possíveis diferenças na microbiota dessas mulheres. A primeira análise (Figura 5) foi demonstrado o número de cópias de DNA bacteriano de *Firmicutes* e do gênero *Clostridium* no grupo de mulheres com SM entre as fases reprodutivas (mulheres em Pré e Pós-menopausa). Não foi observada diferença significativa entre os estágios de envelhecimento reprodutivo tanto para o filo quanto para o gênero analisados, porém mulheres em pré-menopausa apresentaram um maior número de cópias de DNA bacteriano referente ao filo *Firmicutes* ($1,96 \times 10^{20}$), e mulheres em pós-menopausa uma maior quantidade de DNA bacteriano referente ao gênero *Clostridium* ($2,35 \times 10^{20}$). A mesma análise comparativa foi feita para os grupos OB/SB (Figura 6) e Eutróficas (Figura 7) separadamente, tendo como resultado que tanto as mulheres em pré-menopausa do grupo OB/SB como do grupo de mulheres Eutróficas possuíam em sua microbiota uma maior quantidade de números de cópias de DNA referente ao filo *Firmicutes*, já as mulheres em pós-menopausa foi observado uma maior quantidade do gênero *Clostridium*.

Um estudo transversal semelhante realizado com 74 mulheres em pré-menopausa encontrou uma maior proporção de *Firmicutes/Bacteroidetes* em mulheres com distúrbios metabólicos (DM), quando comparada a mulheres obesas e com sobrepeso sem distúrbios metabólicos e grupo controle com mulheres eutróficas (CHENG *et al.*, 2012). Nesse mesmo estudo foi encontrado na microbiota intestinal de mulheres com DM maiores quantidades de *Clostridium sp.* Estudos com camundongos obesos mostraram que esses animais possuem em sua microbiota intestinal uma maior quantidade do filo *Firmicutes* e uma menor do filo *Bacteroidetes*, sendo o primeiro associado a um aumento na capacidade de coletar energia da dieta (LEY *et al.*, 2005, TURNBAUGH *et al.*, 2006). De acordo com SANTOS-MARCOS *et*

al., (2018) mulheres em pré-menopausa apresentam em sua microbiota intestinal uma razão mais elevada de *Firmicutes/Bacteroidetes* do que mulheres em pós-menopausa. Apesar do nosso estudo não ter avaliado *Bacteroidetes*, os níveis de *Firmicutes* maiores em pré e pós menopausa podem auxiliar em estudos futuros sobre o ganho de peso nessa fase, já que *Firmicutes* é associado a microbiota de pessoas com obesidade

Em relação a obesidade, ela afeta 65% das mulheres em pós-menopausa e está associada ao aparecimento de disfunção metabólica (LEENERS *et al.*, 2017). Bactérias da família *Clostridiaceae* que abrigam o gênero *Clostridium*, avaliado neste estudo vem se associando a obesidade, um estudo com isoflavonas de soja em mulheres na pós-menopausa suprimiu a concentração dessas bactérias (FRANKENFELD *et al.*, 2014 ; NAKATSU *et al.*, 2014). Não existem muitos relatos na literatura que associem o filo e o gênero analisados a síndromes desse estudo e ao estágio de envelhecimento reprodutivo.

Posteriormente foi feita a análise comparativa do número de cópias de DNA bacteriano presente nos grupos (SM – OB/SB – Eutróficas) e sua comparação entre os estágios reprodutivos pré e pós menopausa. Essa análise foi feita primeiro para o filo *Firmicutes* (Figura 8) e depois para o gênero *Clostridium* (Figura 9), de forma separada. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma dessas duas análises porém, ao analisarmos o filo *Firmicutes* é indicativo que mulheres na pré-menopausa com SM apresentam um maior número de cópias de DNA ($1,965 \times 10^{20}$), o mesmo ocorreu na fase de pós-menopausa ($1,880 \times 10^{20}$) com SM. Ao analisarmos o gênero *Clostridium* destacou-se que o grupo SM na pré-menopausa e na pós-menopausa possuem maiores cópias de DNA.

Observando então essa quantificação de *Firmicutes* e *Clostridium* dentre os três grupos e suas fases Pré e Pós menopausa, pode-se discorrer sobre alguns aspectos. Neste estudo avaliando o grupo SM apresentaram níveis mais elevados de glicose, triglicérides, concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e menores concentrações de HDL, resultado esse que já foi observado em outro estudo (CHENG *et al.*, 2012). Avaliando todos os dados em conjunto pode-se sugerir que há uma possível relação entre a presença de SM com os maiores níveis do filo *Firmicutes* e do gênero *Clostridium* com um perfil mais aterogênico. Porém devido as limitações do estudo, um N amostral pequeno, essas são suposições que levam a essas relações. É necessário minimizar as limitações para obter a certeza dessa correlação.

Um estudo realizado com 70 mulheres em fase de climatério residentes da cidade de Ouro Preto – MG, analisou 4 gêneros na microbiota intestinal dessas mulheres utilizando também qPCR, sendo eles *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Neste estudo o gênero que se apresentou mais abundante foi *Clostridium* (73,4%) (SILVA, 2021),

sugerindo que talvez possa existir uma relação do aumento desse gênero na microbiota intestinal com esse período.

As últimas análises buscaram possíveis correlações entre os níveis de *Firmicutes* e *Clostridium* com as variáveis bioquímicas, hormonais (Tabela 6) e metabólicas (Tabela 7) em cada grupo de mulheres (SM, OB/SB e Eutróficas). Foi observado no grupo de SM, correlação entre *Firmicutes* e cálcio ($p=0,0049$) e *Firmicutes* e LH ($p=0,0058$), para o gênero *Clostridium* os mesmos analitos apresentaram correlação (Tabela 6). O cálcio tem como função manter a saúde neurológica, cardíaca e atua principalmente na manutenção óssea (JAFARI-GIV *et al.*, 2019). Estudos relacionam o período do climatério e a queda do hormônio estrogênio a uma diminuição na densidade óssea, e desenvolvimento de osteoporose (CAULEY *et al.*, 2012; GUTHRIE *et al.*, 2004).

Um estudo com a população coreana analisou a associação da ingestão de cálcio na dieta com síndrome metabólica e como resultado foi observado que em mulheres em pós-menopausa a incidência de síndrome metabólica diminuiu significativamente no grupo que a ingestão diária de cálcio era > 400 e ≤ 800 mg em comparação com o grupo cuja ingestão era ≤ 400 mg por dia. Além disso, a pesquisa relatou que a prevalência de osteoporose diminuiu com o aumento moderado na ingestão de cálcio em mulheres na pós menopausa (KIM *et al.*, 2017). Em 1998 Zemel *et al.*, relacionaram que o cálcio na dieta poderia contribuir para a prevenção da obesidade. Outro estudo com ratos albinos observou que o cálcio se liga aos ácidos graxos e a bile no intestino diminuindo assim a absorção de gordura e redução do colesterol (FLEISCHMAN *et al.*, 1966). Como foi observado em nossos resultados as mulheres com SM são o grupo que possui maior colesterol, além disso vários estudos relacionaram *Firmicutes* e *Clostridium* a microbiotas de indivíduos obesos, com níveis elevados de LDL, triglicerídeos e baixos níveis de HDL podendo assim ser feita uma correlação entre o cálcio e o filo e gênero estudados (LEY *et al.*, 2005, TURNBAUGH *et al.*, 2006, CHENG *et al.*, 2012). Uma dieta pobre em cálcio pode se associar com o aumento das bactérias pertencentes a *Firmicutes* que inclui *Clostridium*.

O Hormônio Luteinizante (LH) é produzido na Adeno-hipófise e tem como função estimular a ovulação e a formação do corpo lúteo, esse hormônio é muito importante no ciclo reprodutivo da mulher (ARRUDA *et al.*, 2011). Com a chegada do climatério a comunicação entre o hipotálamo, adeno-hipófise e ovários sofre alterações, ocorre um decaimento dos folículos ovarianos, mas a adeno-hipófise continua a secretar o hormônio folículo estimulante (FSH) e LH, aumentando assim a concentração desses hormônios na corrente sanguínea (BURGER, 2008, BRASIL, 2008). A hiperandrogenemia (HA) é uma das características da

Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), mulheres com essa síndrome tem o LH mais elevado que por sua vez produz andrógenos em excesso enquanto o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) é reduzido sendo responsável pelo comprometimento da foliculogênese (AZZIZ *et al.*, 2016). A HA vem se relacionando a maiores chances de desenvolvimento de obesidade, hipertensão, diabetes tipo 2, resistência à insulina, alguns desses fatores são características de indivíduos que possuem SM (QI *et al.*, 2021). Como dito anteriormente alguns estudos relacionam a alteração da microbiota induzida por obesidade a um aumento da proporção *Firmicutes/ Bacteroidetes* na microbiota intestinal (BERVOETS *et al.*, 2013, LEY *et al.*, 2005, TURNBAUGH *et al.*, 2006). *Clostridium* também vem se associando a modificações na microbiota de indivíduos obesos e com distúrbios metabólicos CHENG *et al.*, 2012). Sendo possível que exista uma relação entre o aumento de *Firmicutes* e *Clostridium* com um aumento do hormônio LH.

Nossos resultados mostraram no grupo de mulheres Eutróficas uma correlação negativa entre *Firmicutes* e TSH, $p= 0,0237$ (Tabela 5). Isso pode indicar que o filo estudado tem um impacto nesse hormônio, por exemplo um aumento de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* pode ocasionar um decréscimo no nível do hormônio tiroestimulante (TSH). Existem estudos que correlacionam as concentrações de TSH e o hipotireoidismo a idade avançada (SURKS; HOLLOWELL, 2007, RAZVI *et al.*, 2008). Um estudo com mulheres da cidade da Poznan, Polônia observou que o nervosismo em mulheres na menopausa está relacionado ao estado dos hormônios tireoidianos (SLOPIEN *et al.*, 2020). Entre os filios dominantes na microbiota intestinal destaca-se *Firmicutes* que é composto em sua maioria por bactérias gram positivas e *Bacteroidetes* que tem predomínio de bactérias gram negativas. O aumento de bactérias gram negativas na microbiota intestinal foi associado ao aumento da permeabilidade intestinal (SCHIMIDT, 2017; FLOR, 2017). Uma alteração na composição da microbiota (disbiose) aumenta a permeabilidade intestinal que tem impacto direto na tireoide (FRÖHLICH; WAHL, 2019, LERNER; JEREMIAS; MATTHIAS, 2017).

É importante ressaltar que o N amostral (37 mulheres) deste estudo foi um fator limitante nas análises, é possível observar na tabela 1 que o número de mulheres em cada subgrupo, sendo eles pré-menopausa e pós-menopausa é pequeno. Sendo assim é necessário aumentar o N amostral para obter mais robustez em nossos resultados.

8 CONCLUSÃO

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- Os dados sociodemográficos mostraram uma associação entre baixo grau de escolaridade e maior número de mulheres com síndrome metabólica no climatério.
- Observou-se que todos os analitos bioquímicos, hormonais e metabólicos tiveram níveis mais elevados no grupo de mulheres com SM.
- Em relação aos ensaios de qPCR utilizando as amostras fecais não foi observada nenhuma diferença estatística, porém é indicativo que o grupo SM apresenta maior número de cópias de *Firmicutes* e *Clostridium* em relação a mulheres OB/SB e Eutróficas.
- A correlação nos grupos entre o filo e gênero com os analitos hormonais, bioquímicos e metabólicos mostrou uma associação significativa no grupo SM do filo *Firmicutes* com cálcio e LH, e do gênero *Clostridium* com cálcio e LH. Já no grupo de mulheres Eutróficas a associação ocorreu entre *Firmicutes* e TSH.

Em conjunto podemos concluir uma relação entre as mudanças bioquímicas, hormonais e metabólicas em mulheres com síndrome metabólica e em transição menopausal, mais estudos são necessários para saber se essas mudanças são acompanhadas por alterações significativas na microbiota fecal. É necessário aumentar o N amostral para obter mais robustez em nossos resultados.

9 PERSPECTIVAS

- Promover a continuidade nas análises da microbiota fecal dos grupos de mulheres analisadas nesse estudo que residem em Ouro Preto, acompanhando as mesmas através do projeto de extensão ligado ao Programa AMBAR “Microbiota e Saúde da Mulher no climatério.”
- Utilizar abordagens ômicas para identificar espécies bacterianas predominantes na microbiota das mulheres que estão no climatério e apresentam os sintomas da Síndrome Metabólica.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRÉN, I. L. *et al.* Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 719–726, 2015.

Arcanjo, C. L., Piccirillo, L. J., Machado, I. D. V., de Andrade Jr, C. R., Clemente, E. L., & Gomes, M. D. B. (2005). Avaliação de dislipidemia e de índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 49(6), 951-958.

ARRUDA, CG; FERNANDES, A; CEZARINO P *et al.* Tensão Pré Menstrual. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2011.

AZZIZ, R. *et al.* Polycystic ovary syndrome. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16057, 2016.

BAHL, M. I.; BERGSTRÖM, A.; LICHT, T. R. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 329, n. 2, p. 193–197, 2012.

BERVOETS, L.; HOORENBEECK, K.; KORTLEVEN, I.; NOTEN, C.; VAEL, C. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Bélgica: Gut Pathogens*. v. 5, n. 13, p: 10, abr. 2013.

Borgo, F., Verduci, E., Riva, A., Lassandro, C., Riva, E., Morace, G., & Borghi, E. (2016). Relative Abundance in Bacterial and Fungal Gut Microbes in Obese Children: A Case Control Study. *Childhood Obesity*. 12 (1), 78.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Manual de atenção a mulher no climatério e menopausa. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 192p

BURGER, H. The Menopausal Transition—Endocrinology. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 5, n. 10, p. 2266–2273, out. 2008.

CASTELL, J. V. *et al.* **Acute-phase Response of Human Hepatocytes: Regulation of Acute-phase Protein Synthesis By Interleukin-6.**

CASTELL, J. V. *et al.* Acute-phase response of human hepatocytes: Regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1179–1186, 1990.

CAULEY, J. A. *et al.*,. Bone resorption and fracture across the menopausal transition. **Menopause**, v. 19, n. 11, p. 1200–1207, nov. 2012.

CHENG, S. *et al.* Women with and without metabolic disorder differ in their gut microbiota composition. **Obesity**, v. 20, n. 5, p. 1082–1087, 2012.

- D'ARGENIO, V.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p. 97–102, dez. 2015.
- DE LORENZI, D. R. S. *et al.* Fatores associados à qualidade de vida após menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 312–317, 2006.
- DE LORENZI, D. R. S. Avaliação da qualidade de vida no climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 3, p. 103–106, mar. 2008.
- DE LORENZI, D. R. S. *et al.* Characterization of the quality of life by menopausal status among women in the South region of Brazil. **Revista Brasileira de Saude Materno Infantil**, v. 9, n. 4, p. 459–466, 2009.
- DE MARCHI, R. *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–166, 2017.
- EDITORIAL, C. Diretrizes. **Alamedas**, v. 8, n. 2, p. 178–180, 19 jan. 2021.
- FOGAÇA, E. M. *et al.* Prevalência de obesidade em mulheres na pós-menopausa atendidas em um ambulatório no sul do Brasil. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 10, n. 1, p. 46–52, 2019.
- FONSECA, M. I. H. *et al.* Changes in lipoprotein subfractions following menopause in the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Maturitas**, v. 130, n. August, p. 32–37, 2019.
- FRANKENFELD, C. L. *et al.* Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 526–530, 2014.
- FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Microbiota and Thyroid Interaction in Health and Disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 8, p. 479–490, 2019.
- FLINT, H. J. *et al.* Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, 2012.
- FLOR, Aline Ribeiro. **Disbiose e obesidade: uma revisão de literatura**. João Pessoa. Monografia (Graduação), Universidade Federal da Paraíba, 2017. GALIC, Sandra;
- FURUHASHI, M.; TUNCMAN, G.; GORGUN, C. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. Massachusetts: **Nature International Journal of Science**. v. 486, n. 21, p: 959–965, jun. 2007.
- GASPARD, U. J.; GOTTAL, J.-M.; VAN DEN BRÛLE, F. A. Postmenopausal changes of lipid and glucose metabolism: a review of their main aspects. **Maturitas**, v. 21, n. 3, p. 171–178, abr. 1995.
- GREGORY, Jon S. Oakhill; STEINBERG, R. **Adipose tissue as an endocrine organ**. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 316, n.1, p. 129-139, 2010.

GELONEZE, B. *et al.* HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 281–287, 2009.

GORDON, T. *et al.* High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. **The American journal of medicine**, v. 62, n. 5, p. 707–14, maio 1977.

GOMES, M. J. P. Gênero *Clostridium* spp. **Favet-Ufrgs**, p. 1–67, 2013.

GUTHRIE, J. *et al.*,. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. **Climacteric**, v. 7, n. 4, p. 375–389, 27 dez.2004.

Haidar, F. H.; OLIVEIRA, U. F.; NASCIMENTO, L. F. C. Escolaridade materna: correlação com os indicadores obstétricos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, p. 1025–1029, ago. 2001.

HARLOW, S. D. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Climacteric**, v. 15, n. 2, p. 105–114, 16 abr. 2012.

HILLMAN, A. J. *et al.* **Association of High Sensitivity C-Reactive Protein Concentrations and Metabolic Syndrome among Thai AdultsAsian Biomed (Res Rev News)**.

HILLMAN, A. J. *et al.* Association of High Sensitivity C-Reactive Protein Concentrations and Metabolic Syndrome among Thai Adults. **Asian biomedicine : research, reviews and news**, v. 4, n. 3, p. 385–393, jun. 2010b.

HONOUR, J. W. Biochemistry of the menopause. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 18–33, 2018.

IBGE. Sinopse do Censo demográfico 2010. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, RJ.**, p. 261, 2011.

IOSSIFIDIS, A.; BRUETON, R. N.; NUNAN, T. O. Bone-scintigraphy in painful bipartite patella. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1212–1213, out. 1995.

JAFARI-GIV, Z. *et al.*,. Association of body mass index with serum calcium and phosphate levels. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 975–980, mar. 2019.

JAMAR, G. *et al.* Relationship between fatty acids intake and *Clostridium coccoides* in obese individuals with metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 113, p. 86–92, nov. 2018.

JIAN, C. *et al.* Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227285, 15 jan. 2020.

- JIAO, L. *et al.* Spatial Characteristics of Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiota in Humans. **Microbial Ecology**, n. 0123456789, 5 jul. 2021.
- JOO, J. K. *et al.* The Association between Serum Uric Acid Level and Incidence of Metabolic Syndrome according to Menopausal Status in Korean Women. **Journal of Menopausal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 126, 2014.
- Kirkpatrick, F.H. Overview of agarose gel properties. Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications 9-22 (1991).
- KOREN, O. *et al.* Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 470–480, 2012.
- LAMISSE, F. Ménopause et syndrome métabolique. **Option/Bio**, v. 20, n. 415, p. 12–13, mar. 2009.
- LEE, P. Y. *et al.* Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **Journal of Visualized Experiments**, n. 62, p. 1–5, 2012.
- LEENERS, B. *et al.* Ovarian hormones and obesity. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 3, p. 300–321, 2017.
- LEY, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2 ago. 2005.
- LOUIS, P.; FLINT, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 1, p. 1–8, 2009.
- LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 8 jan. 2017.
- LYE, H. S. *et al.* The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3755–3775, 2009.
- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 67–72, 5 fev. 2003.
- MAGEROSKA VIEIRA, T. M. *et al.* VIVENCIANDO O CLIMATÉRIO: PERCEPÇÕES E VIVÊNCIAS DE MULHERES ATENDIDAS NA ATENÇÃO BÁSICA. **Enfermagem em Foco**, v. 9, n. 2, p. 40–45, 26 nov. 2018.
- MARIAT, D. *et al.* The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–6, 2009.
- MAZIDI, M. *et al.* Gut microbiome and metabolic syndrome. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 10, n. 2, p. S150–S157, 2016.

- MCGOWN, C.; BIRERDINC, A.; YOUNOSSI, Z. M. Adipose tissue as an endocrine organ. **Clinics in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2014.
- MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ.
- MORRISON, DJ e PRESTON, T. (2016) Formação de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota intestinal e seu impacto no metabolismo humano. *Gut micróbios* **7**: 189 – 200.
- NAKATSU, C. H. *et al.* Fecal Bacterial Community Changes Associated with Isoflavone Metabolites in Postmenopausal Women after Soy Bar Consumption. 2014.
- NASH, D. T. Relationship of C-reactive protein, metabolic syndrome and diabetes mellitus: Potential role of statins. **Journal of the National Medical Association**, v. 97, n. 12, p. 1600–1607, 2005.
- NICHOLLS, A.; SNAITH, M. L.; SCOTT, J. T. Effect of Oestrogen Therapy on Plasma and Urinary Levels of Uric Acid. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5851, p. 449, 1973.
- OKOSUN, I. S. Metabolic syndrome and C-reactive protein in American adults: The impact of abdominal obesity. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 6, n. 4, p. 289–297, 2008.
- OLIVEIRA, L. V. A. *et al.* Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 11, p. 4269–4280, nov.2020.
- PEDACE, A. F.; HALBE, H. W Aspectos psicológicos do climatário. *Sin. Ginec. Obstet.* 1: 2, 1992.
- PÉREZ-COBAS, A. E. *et al.* Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. **Gut**, v. 62, n. 11, p. 1591–1601, nov. 2013.
- QI, X. *et al.* The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. **Gut microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2021.
- QIN, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59–65, mar. 2010.
- RAMAN, R. *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.
- REZENDE, F. A. C. *et al.* Body mass index and waist circumference: Association with cardiovascular risk factors. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 666–671, 2006.
- SANTOS-MARCOS, J. A. *et al.* Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. **Maturitas**, v. 116, n. July, p. 43–53, out. 2018.
- SANTOS, Verena M. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. SCHMIDT, Leucinéia; SODER, Taís Fátima; DEON, Rúbia Garcia; BENETTI, Fábila. **OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM A MICROBIOTA INTESTINAL**. v. 6, n.2, p. 29–43, 2017.

- SHIRAZI, M. *et al.* The effects of nigella sativa on anthropometric and biochemical indices in postmenopausal women with metabolic syndrome. **Endocrine**, v. 69, n. 1, p. 49–52, 2020.
- SILVA, Thayane Christine Alves da. **Caracterização preliminar da microbiota fecal de mulheres no climatério.2021 114 f.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.
- SLOPIEN, R. *et al.* Climacteric symptoms are related to thyroid status in euthyroid menopausal women. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 43, p. 75–80, 2020.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diagnóstico e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 1–27, 2005.
- SUMINO, H. *et al.* Reduction of serum uric acid by hormone replacement therapy in postmenopausal women with hyperuricaemia. **Lancet**, v. 354, n. 9179, p. 650, 1999.
- SURKS, M. I.; HOLLOWELL, J. G. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the U.S. population: Implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 12, p. 4575–4582, 2007.
- TANG, W. H. W. *et al.* Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 17, p. 1575–84, 25 abr. 2013.
- TORRES JIMENEZ, ANA PAOLA & TORRES RINCON, J. M. Climaterio y menopausia. GPC. **Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM**, v. 61, p. 51–58, 2018.
- TOTH, M. J. *et al.* Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24, n. 2, p. 226–31, 3 fev. 2000.
- TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.
- TURNBAUGH, P. J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–4, 22 jan. 2009.
- VELOSO, G. G. V. *et al.* Prevalência de Síndrome Metabólica em Mulheres Climatéricas. **Rev Bras cardiol**, v. 27, n. 1, p. 20–27, 2014.
- WAMALA, S. P. *et al.* Education and the metabolic syndrome in women. **Diabetes Care**, v. 22, n. 12, p. 1999–2003, 1 dez. 1999.
- WAN, Y. *et al.* Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1417–1429, ago. 2019.
- WANG, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease.

Nature, v. 472, n. 7341, p. 57–63, 7 abr. 2011.

WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, Geneva; 2019.

WHO. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 866, p. 1-107, 1996.

WILSON TANG, W. H. *et al.* Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. **n engl j med**, v. 17, p. 1575–84, 2013.

WINGROVE, C. S.; WALTON, C.; STEVENSON, J. C. The effect of menopause on serum uric acid levels in non-obese healthy women. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 47, n. 4, p. 435–438, 1998.

YUDKIN, J. S. *et al.* **C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue**. Disponível em: <<http://www.atvbaha.org>>.

YUDKIN, J. S. *et al.* Obesity , Insulin Resistance , and Endothelial Dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 972–978, 1999b.

ZEMEL MB. Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. **Mol Cell Biochem**. 1998 Nov;188(1-2):129-36.

11 ANEXOS

11.1 ANEXO A: APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UFOP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da correlação da microbiota intestinal e vaginal no desenvolvimento de doenças em mulheres no climatério.

Pesquisador: RENATA GUERRA DE SA COTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29723420.9.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.057.304

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1511637.pdf de 04/03/2020) e do Projeto Detalhado.

Os seres humanos e sua microbiota integram relações genéticas e metabólicas as quais auxiliam na sua adaptação ao meio. A grande maioria desses microrganismos no corpo humano é encontrada no intestino, e distribuída em mais de 500 espécies que auxiliam em diversos processos fisiológicos. A mudança nos hormônios sexuais femininos, em destaque a redução ou ausência do estrogênio, leva à uma modulação da microbiota podendo alterá-la causando uma disbiose intestinal. Esse desequilíbrio é provocado pela diminuição de bactérias boas do intestino, ocasionando alterações no estroboloma, um agregado de microrganismos capazes de metabolizar o estrogênio influenciando nos processos fisiológicos dependentes do mesmo, podendo acarretar o surgimento de doenças crônicas como obesidade, doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes. Diante desse contexto de alterações hormonais que desencadeiam modificações no metabolismo do estrogênio podendo deflagrar doenças crônicas, esse estudo visa caracterizar a microbiota intestinal e vaginal de mulheres no climatério, e correlacionar com o

Continuação do Parecer: 3.957.304

9. Os documentos submetidos ao Sistema CEP/Conep que necessitam de assinatura dos responsáveis devem ser encaminhados, preferencialmente, com certificação digital ou por documento digitalizado. Será aceita, em caráter excepcional, a dispensa das assinaturas nos documentos necessários para a submissão dos protocolos de pesquisa, durante o período em que estiverem instaladas as medidas de segurança para a saúde pública. A devida retificação deverá ser submetida ao sistema CEP/CONEP, assim que possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o CEP/UFOP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFOP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e/ou Res. CNS 510/16, manifesta-se pela APROVAÇÃO deste protocolo de pesquisa. Ressalta-se ao pesquisador responsável pelo projeto o compromisso de envio ao CEP/UFOP, um ano após o início do projeto, do relatório final ou parcial de sua pesquisa, encaminhado por meio da Plataforma Brasil, informando, em qualquer tempo, o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1511637.pdf	08/04/2020 14:43:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinalDois.docx	04/03/2020 16:06:57	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Declaração do Patrocinador	DeclaragastosProjetoCEPUFOP.pdf	04/03/2020 15:59:08	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Orçamento	OrdoProjetoCEPok.docx	04/03/2020 15:57:50	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Cronograma	CronogramadoProjetoCEP.pdf	04/03/2020 15:57:37	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostook.pdf	04/03/2020 15:54:31	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.docx	18/02/2020 16:10:43	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito

Continuação do Parecer: 3.957.304

Ausência	TCLE.docx	18/02/2020 16:10:43	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
----------	-----------	------------------------	--------------------------	--------

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

OURO PRETO, 06 de Abril de 2020