

LUÍS FERNANDO DE SOUSA MORAES

MICROBIOTA INTESTINAL E ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA E CONSUMO DE FIBRAS EM PACIENTES
CELÍACOS SOB DIETA LIVRE DE GLÚTEN

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M827m
2013

Moraes, Luís Fernando de Sousa, 1984-

Microbiota intestinal e associação com ácidos graxos de cadeia curta e consumo de fibras em pacientes celiacos sob dieta livre de glúten / Luís Fernando de Sousa Moraes. – Viçosa, MG, 2013.

xv, 93f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Intestinos - Microbiologia. 2. Ácidos graxos. 3. Doença celiaca. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22 ed. 616.34

LUÍS FERNANDO DE SOUSA MORAES

MICROBIOTA INTESTINAL E ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA E CONSUMO DE FIBRAS EM PACIENTES
CELÍACOS SOB DIETA LIVRE DE GLÚTEN

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de agosto de 2013.

Cristiane Alves da Silva Menezes

Łukasz Marcin Grzeřkowiak
(Coorientador)

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Paulino e Maria da Glória, e à minha irmã,
Ana Paula.*

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meus exemplares e ídolos pais, pelo incentivo e apoio incondicionais durante toda minha infância, adolescência e juventude, nos momentos difíceis e nas alegrias cotidianas e inesperadas que sempre dividimos e passamos juntos. Por TUDO que eu sou hoje!

À melhor irmã do mundo, também pela paciência, ensinamentos, preocupações, “puxadas de orelha” e carinho sempre.

A todos os meus familiares (avôs, avós, tios, tias e primos) pela torcida e pelas rezas.

À minha queridíssima orientadora, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelo voto de confiança e por acreditar em mim, na minha capacidade. Por me fazer crescer, ter calma e suportar a pressão. Obrigado sempre!!!

À Tati Campos, pelo companheirismo, amizade e ótimos momentos que estivemos juntos durante todos esses anos de mestrado. Infinitas saudades!!!

À Flavinha Xavier, pela troca de ideias, pela simpatia e sensatez, pelo incentivo de que tudo ia dar certo. Pelas críticas e elogios, que ajudaram a aprimorar meus conhecimentos e atitudes.

À Tati Fiche, exemplo de pessoa humana e amiga, em que me espelho sempre... Obrigado pelas dicas, pelos conselhos e pela amizade!!!

Ao Łukasz Grzeškowiak, pelo intenso incentivo, pelas excelentes dicas, pela troca de experiências, pelo convívio e ótimas risadas. Por não me fazer desanimar ou “querer suicidar” quando eu achava que tudo estava perdido. E por me ensinar um pouco o polonês, quando tentei pronunciar seu nome corretamente (risos) Muito obrigado mesmo!!!

À Helen Hermsdorff, pelas conversas e valiosas dicas. Obrigado!!!

À professora Cristiane Menezes e ao professor Luiz Carlos Crocco, da Universidade Federal de Ouro Preto, por cederem o laboratório com boa vontade e gentileza. Obrigado!!!

Aos meus amigos de graduação, que estiveram presente durante todo o tempo de graduação e que dividiram comigo experiências sensacionais e momentos que jamais sairão da minha cabeça. Em especial: Aninha, Tati Bering, Roberta Nogueira, Naiara Sperandio, Lisiane Lopes, Hugo Comparotto, Alejara Lage, Fernanda Drummond, Morghana Zacchi, Raquel de Menezes,

Júlia Carraro, Flávia Galvão, Dani Silva, Sarah Vieira e Karine Zani. Nutrição integração!!!

Aos meus amigos de Viçosa, pelo apoio e, principalmente, pelos momentos excelentes que passamos juntos e me ajudaram a não ficar extremamente estressado (risos). Pela troca de experiências, pelo conhecimento e lições de vida que cada um proporcionou em momentos inesquecíveis da minha vida. Em especial: Vanderson Magalhães, Valcívica Cardoso, William Gonzaga, Cássia Silva, Ygor Coutinho, Guilherme Borges, Alice Costa, Eduardo Lessa, Vanessa Sabioni, Laura Lélis, keise Scherrer, Paloma Freitas, Roberta Bhering, Natália Gouvêa. Amizade eterna!!!

Às minhas amigas de infância, pelo amor e amizade sempre. Mesmo longe, estamos mais do que perto!!! Em especial: Ana Kellen Assis, Ana Flávia Gussen, Eduarda Gussen, Mariana Godoi e Tassya Carvalho. Não falo nada!!!

Aos amigos do LABIN, pelo ótimo convívio, por deixar que eu colocasse o ar condicionado na temperatura mais baixa (risos), pela alegria inclusive nos momentos de análises, pela distração durante as horas do cafezinho e confraternizações. Eterno obrigado!!!

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Saúde, pelos valiosos ensinamentos. Muito obrigado!!!

Aos voluntários, que proporcionaram a execução deste trabalho.

Em especial também a Deus, por ter colocado em minha vida pessoas tão preciosas e por ter me direcionado em cada escolha que fiz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DC.....	3
2.2. FISIOPATOLOGIA DA DC.....	4
2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DC.....	6
2.4. DIAGNÓSTICO DA DC.....	7
2.5. TRATAMENTO DA DC.....	11
2.6. MICROBIOTA INTESTINAL.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. GERAL.....	17
3.2. ESPECÍFICOS.....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. APRESENTAÇÃO.....	18
4.2. POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	18
4.2.1. <i>Cr�terios de inclus�o</i>	19
4.2.2. <i>Cr�terios de exclus�o</i>	20
4.3. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	20
4.4. M�TODOS UTILIZADOS NA COLETA DE DADOS.....	21
4.4.1. <i>Question�rios</i>	21
4.4.2. <i>Determina�o do anticorpo anti-tTG</i>	23
4.4.3. <i>Avalia�o do consumo de macronutrientes e fibras</i>	24
4.4.4. <i>Avalia�o antropom�trica e da composi�o corporal</i>	25
4.4.5. <i>Aferi�o da press�o arterial</i>	27
4.4.6. <i>Caracteriza�o de grupos de micro-organismos da microbiota fecal</i>	28

4.4.7. Identificação e quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta.....	29
4.4.8. Determinação do pH fecal.....	29
4.4.9. Retorno aos pacientes.....	29
4.4.10. Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO.....	31
5.1.1. Referências bibliográficas.....	37
5.2. ARTIGO 1.....	51
5.3. ARTIGO 2.....	65
6. CONCLUSÕES.....	78
7. APÊNDICES	79
APÊNDICE A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.....	79
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80
APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO GERAL	81
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ)	84
APÊNDICE E – INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DOS RA.....	85
APÊNDICE F – FORMULÁRIO DE RETORNO DOS RESULTADOS AOS PACIENTES...	88
APÊNDICE G – FOLDER PARA PACIENTES CELÍACOS.....	90
APÊNDICE H – FOLDER PARA INDIVÍDUOS DO GRUPO GCO.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µg	Micrograma
Mm	Micrômetro
µmol	Micromol
ω-3	Ômega-3
ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
ABS	Absorvância
AF	Atividade Física
AGA	Anticorpo Anti-Gliadina
Anti-Ttg	Anti-transglutaminase 2
APCs	Células Apresentadora de Antígeno
B ₁	Vitamina B ₁ – Tiamina
Ca+2	Íons cálcio
DC	Doença Celíaca
DCV	Doenças Cardiovasculares
DEXA	Raios-x de dupla energia
DGP	Anti-peptídeos Deamidados da Gliadina
dL	Decilitro
DLG	Dieta livre de glúten
DP	Desvio-padrão
DRI's	<i>Dietary Reference Intakes</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EER	Necessidade de Energia Estimada
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i>
EMA	Anticorpo anti-endomísio
EUA	Estados Unidos
G	Gramma
GC	Gordura corporal
GCO	Grupo Controle
GDC	Grupo Doença Celíaca
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IELs	Linfócitos Intraepiteliais
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-15	Interleucina 15
IMC	Índice de Massa Corporal
INF-γ	Interferon Gama
IOM	Instituto de Medicina
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
M	Metro
MG	Miligrama
MG	Minas Gerais
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
Min	Minuto
mL	Mililitro

Mm	Milímetro
MMA	Massa magra abdominal
mmHg	Milímetros de Mercúrio
Mmol	Milimol
N	Amostra
NAF	Nível de Atividade Física
NK	Célula Natural Killer
Nm	Nanômetros
Nmol	Nanomol
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Nível de significância estatística
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PGs	Prostaglandinas
RA	Registro Alimentar
RCQ	Relação Cintura Quadril
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
TACO	Tabela de Composição de Alimentos Brasileira
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
tTG	Transglutaminase tecidual
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VET	Valor Energético Total
vs.	<i>Versus</i>
WGO	<i>World Gastroenterology Organization</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Algoritmo para diagnóstico da DC	8
Quadro 1. Sensibilidade e especificidade dos principais anticorpos utilizados no screening sorológico da DC	9
Quadro 2. Classificação progressiva das lesões da mucosa do intestino delgado segundo critério de Marsh	11
Quadro 3. Alimentos substitutos do glúten	12

METODOLOGIA

Figura 1. Fluxo de recrutamento e exclusão dos voluntários portadores de doença celíaca	19
Figura 2. Procedimento adotado para a coleta de dados	20
Quadro 1. Teor alcoólico (v/v) das bebidas consumidas pelos participantes do estudo	21
Quadro 2. Padronização das medidas caseiras de consumo de bebidas alcoólicas	22
Quadro 3. Níveis de atividade física (NAF) para cálculo da EER de acordo com a classificação do IPAQ	25
Quadro 4. Pontos de corte e classificação do estado nutricional segundo Índice de Massa Corporal (IMC)	26
Quadro 5. Pontos de corte e risco de complicações metabólicas em relação ao perímetro da cintura, perímetro do quadril e relação cintura quadril	27
Quadro 6. Pontos de corte e classificação do percentual de gordura corporal	27
Quadro 7. Pontos de corte utilizados na avaliação da pressão arterial em adulto	28

RESULTADOS

Caracterização da população

Figura 1. Caracterização da população estudada segundo sexo e faixa etária	31
Figura 2. Principais sintomas relatados pelos pacientes celíacos e proporção de indivíduos que os apresentaram antes do diagnóstico da DC, Viçosa-MG, 2013	32

Artigo 2

Figura 1. Percentage of the major bacterial groups as compared to the total amount of bacteria in feces from celiac adult subjects and controls and analyzed by FC-FISH	70
--	-----------

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS

Caracterização da população

Tabela 1. Hábitos de vida segundo presença ou ausência da DC, Viçosa-MG, 2013	32
Tabela 2. Características da história clínica de acordo com a presença ou ausência de DC, Viçosa-MG, 2013	33
Tabela 3. Consumo alimentar de acordo com a presença ou ausência de DC. Viçosa-MG, 2013	35
Tabela 4. Medidas antropométricas e de composição corporal segundo gênero. Viçosa-MG, 2013	35

Artigo 1

Tabela 1. Main findings related to microbiota composition in CD subjects. The content includes studies developed with distinct populations, samples and methodology approach.	53
--	-----------

Artigo 2

Tabela 1. Bacterial counts (log cells/g) in fecal samples from celiac and control groups. Results are represented as median with interquartile range (IQR)	71
Tabela 2. Ratio of Gram-positive (G ⁺) to Gram-negative (G ⁻) bacteria, using bacterial counts (log cells/g) and percentages (%) in celiac and control groups	72
Tabela 3. Concentration (μ mol/g feces) of fecal SCFA from the celiac and control groups	72

RESUMO

MORAES, Luís Fernando de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Microbiota intestinal e associação com ácidos graxos de cadeia curta e consumo de fibras em pacientes celíacos sob dieta livre de glúten.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Helen Hermana Miranda Hermsdorff e Łukasz Marcin Grześkowiak.

A doença celíaca (DC) é uma condição inflamatória sistêmica, que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos. O desenvolvimento da DC é um processo complexo que envolve a interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos, resultando em autoimunidade após exposição aos fatores dietéticos desencadeantes (prolaminas), componentes do “glúten”, o qual está presente em alimentos como trigo, centeio, cevada e, ainda, aveia. A DC é caracterizada por um processo inflamatório que envolve a mucosa do intestino delgado, evidenciado pela alteração histológica com hiperplasia das criptas entéricas, atrofia das vilosidades, infiltração linfocitária no epitélio intestinal e na lâmina própria. Além do glúten, outro fator ambiental, como a alteração na microbiota intestinal, tem sido sugerido estar associado ao aparecimento dessa doença na infância e, também, na fase adulta. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi analisar a composição da microbiota intestinal de pacientes adultos com DC e compará-la com um grupo comparativo saudável. Foram incluídos no estudo vinte pacientes celíacos ($36,3 \pm 13,7$ anos; $22,5 \pm 3,2$ kg/m²), com diagnóstico confirmado por biópsia intestinal e em tratamento com dieta livre de glúten (DLG), e trinta e nove não portadores de DC ($36,0 \pm 13,0$ anos; $23,8 \pm 3,7$ kg/m²), pareados por sexo e idade com os pacientes celíacos na proporção de 2:1. A população de pacientes celíacos foi composta predominantemente por mulheres (65%), sendo o tempo de diagnóstico e de seguimento da DLG de $1,2 \pm 0,6$ anos. Todos os resultados do teste sorológico do anticorpo IgA anti-transglutaminase foram negativos, demonstrando aderência à DLG. Os grupos não apresentaram diferenças significantes em relação às variáveis sócio-demográficas e antropométricas ($p > 0,05$). Em relação à microbiota, *Enterobacterium* foi o maior grupo detectado com 10,5 % em celíacos e com 10,1 % nos controles. Em indivíduos celíacos e controles, *Bifidobacterium* representou 7,9 % e 8,6%, respectivamente. O percentual de *Bacteroides-Prevotella* foi de 6,3 % no grupo celíaco e 5,1 % no controle. *Clostridium*

histolyticum abrangeu 5,6 % e 4,7 % do total de bactérias em celíacos e controle, respectivamente. *Lactobacillus-Enterococcus* foi o menor grupo representado com 4,3 % no grupo celíaco e 3,4 % no controle. Os grupos de bactérias não se diferiram entre celíacos e controle. Uma menor quantidade de ácido butírico ($p=0,038$) e de ácidos graxos de cadeia curta total ($p=0,042$) foi observada nas fezes dos indivíduos celíacos. O pH foi menor nos indivíduos que não apresentavam a doença ($p=0,046$). O consumo de fibras foi menor no grupo celíaco, mas sem significância estatística. Foi encontrada correlação negativa entre a ingestão de fibras e os níveis do grupo *Enterobacterium* no grupo celíaco ($r=-0.64$, $p=0.046$). Diante dos resultados obtidos, nota-se que novos estudos são necessários com o intuito de pesquisar alterações na microbiota intestinal, em nível de espécies bacterianas, e relacioná-las com as diferenças encontradas na composição dos ácidos graxos de cadeia curta.

ABSTRACT

MORAES, Luís Fernando de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2013. **Intestinal microbiota and its association with short chain fatty acids and fiber intake in celiac patients under glúten free diet.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Helen Hermana Miranda Hermsdorff and Łukasz Marcin Grzeřkowiak.

Celiac disease (CD) is a systemic inflammatory condition that occurs in genetically predisposed individuals. The development of DC is a complex process, which involves the interaction between genetic, environmental and immunological factors, resulting in autoimmune reactions after exposure to non-tolerable dietary factors (prolamins), components of "gluten", which is present in foods such as wheat, rye, barley, and also oats. CD is characterized by an inflammatory process involving the intestinal mucosa with crypt hyperplasia, villous atrophy, lymphocyte infiltration in the intestinal epithelium and lamina propria. Besides gluten, other environmental factors, such as changes in intestinal microbiota, have been suggested to be associated with CD in childhood and in adulthood. In this context, the aim of the study was to analyze the composition of the intestinal microbiota of CD adult patients and to compare it with healthy controls. The study included twenty celiac patients (36.3 ± 13.7 years old and 22.5 ± 3.2 kg/m²), as confirmed by intestinal biopsy and on GFD, and thirty-nine non-celiac patients (36.0 ± 13.0 years old, 23.8 ± 3.7 kg/m²), matched by age and gender with celiac patients in a 2:1 ratio. The population of celiac patients was predominantly female (65%). Celiac patients were on gluten free diet (GFD) for 1.2 ± 0.6 years. All celiac subjects were negative for the serological IgA anti-transglutaminase antibody, which demonstrates adherence to GFD. The comparison between the groups showed no differences in relation to sociodemographic and anthropometric variables. Regarding to microbiota, *Enterobacterium* was the largest group with 10.5 % detected in celiac and 10.1 % in controls. In celiac individuals and controls, *Bifidobacterium* represented 7.9 % and 8.6 %, respectively. The percentage of *Bacteroides-Prevotella* was 6.3 % in the celiac group and 5.1 % in control. *Clostridium histolyticum* comprised 5.6 % and 4.7 % of the total bacteria in celiac patients and control, respectively. *Lactobacillus-Enterococcus* was the lowest represented group with 4.3 % in the celiac group and 3.4 % in control. All groups of bacteria did not differ between

celiac and control. A lower amount of butyric acid ($p=0.038$) and total short chain fatty acids ($p=0.042$) was observed in the feces of celiac subjects. The pH was lower in individuals without the disease ($p=0.046$). Fiber intake was lower in celiac, but with no statistical significance. Negative correlation was found between fiber intake and *Enterobacterium* group levels in celiac patients ($r=-0.64$, $p=0.046$). Further studies are needed in order to investigate unbalances in the intestinal microbiota, at bacterial species levels, and relate them to the differences in the composition of short chain fatty acids.

1. INTRODUÇÃO

Em 1887, Samuel Gee descreveu sintomas típicos da doença celíaca em crianças, os quais incluíam irritabilidade, diarreia crônica e déficit de crescimento bem como a cura por meio de uma dieta. Desde então, o conhecimento acerca da doença tem sofrido um desenvolvimento revolucionário em relação à epidemiologia, ao diagnóstico e ao tratamento (TACK *et al.*, 2010).

A doença celíaca (DC) é um tipo de doença autoimune sistêmica e ocorre em indivíduos geneticamente predispostos. Desencadeia-se pela ingestão de alimentos à base de cereais contendo “glúten” e pode se desenvolver em qualquer momento da vida (VOLTA & VILLANACCI, 2011).

O glúten corresponde à fração proteica dos grãos do trigo, cevada e centeio. Ocasionalmente, a aveia é contaminada com os cereais mencionados durante seu processamento e, portanto, pode conter traços de glúten (KAGNOFF, 2005). É composto por dois grupos: as prolaminas (solúveis em álcool) e as gluteninas (insolúveis em álcool). A toxicidade do glúten para os pacientes celíacos está, predominantemente, ligada às prolaminas, que correspondem à cerca de 50% da quantidade total do glúten e cuja composição de aminoácidos é rica em glutamina (37%) e prolina (17%). Em cada tipo de cereal, o grupo prolamínico recebe um nome próprio, como a gliadina no trigo, a hordeína na cevada, a secalina no centeio e avenina na aveia (WIESER, 2007). Coletivamente, as proteínas do trigo, cevada e centeio, que ativam a doença celíaca, são denominadas “glúten”. Entretanto, a rigor, o termo glúten é o nome científico apenas para proteína do trigo (KAGNOFF, 2005).

A DC é caracterizada por um processo inflamatório que envolve a mucosa do intestino delgado. Dessa forma, é possível observar alteração histológica com hiperplasia das criptas entéricas, atrofia das vilosidades, infiltração linfocitária no epitélio intestinal e na lâmina própria (SCHUPPAN *et al.*, 2005; CHAND & MIHAS, 2006; TORRES MI & RIOS, 2007). Como consequência, há o desenvolvimento de um quadro de má absorção (GREEN & CELLIER, 2007) que resulta em um amplo espectro de manifestações clínicas, com diferentes graus de severidade, tanto intestinais quanto extraintestinais, dada à sua natureza autoimune e sistêmica (RODRIGO-SÁEZ, 2010; SELIMOGLU & KARABIBER, 2010). Como exemplo dessas

manifestações, há anemia, deficiência de vitaminas e minerais, osteoporose, alteração na microbiota, como também outras doenças autoimunes, associadas a transtornos neurológicos (TORRES & RIOS, 2007).

Atualmente, os cereais potencialmente tóxicos para os celíacos são o trigo, o centeio e a cevada. A toxicidade da aveia ainda é muito discutida na literatura. Esses cereais apresentam uma origem ancestral comum na família da gramínea; no entanto, o trigo, o centeio e a cevada pertencem à tribo *Triticeae*, diferentemente, da aveia – *Avena* (KAGNOFF, 2005). Talvez essa característica justifique o porquê de a aveia ativar a DC apenas em alguns indivíduos, resultando em um menor conteúdo de glutamina e prolina (10-15%) e, portanto, apresentando menor toxidez (FRIC *et al.*, 2011) em relação aos outros cereais. Tem sido sugerido que a aveia, em quantidades moderadas (< 50 g/dia), pode ser bem tolerada por muitos pacientes celíacos, contanto que não haja contaminação cruzada com os outros cereais em seu processamento (THOMPSON, 2003).

Apesar de a DC sintomática não tratada estar associada a morbidades e mortalidade substanciais, a melhora clínica e histológica é, geralmente, observada com uma dieta rigorosa livre de glúten (dieta livre de glúten – DLG) (BERTINI *et al.*, 2008), a qual é suficiente para tratar a maioria dos pacientes em algumas semanas (TACK *et al.*, 2010).

Atualmente, a participação da microbiota intestinal na fisiopatologia da DC tem sido foco de pesquisas. Há divergência, na literatura, no que tange à restauração da microbiota intestinal de pacientes celíacos que seguem a DLG (COLLADO *et al.*, 2009; SANZ, 2010). Um reduzido conhecimento em relação à microbiota intestinal de adultos com DC é observado. Recentemente, diferenças na microbiota intestinal de crianças e adultos com DC têm sido descritas quando comparadas com controles saudáveis (NISTAL *et al.*, 2012a; NISTAL *et al.*, 2012b; COLLADO *et al.*, DI CAGNO *et al.*, 2011).

O possível mecanismo ainda não está totalmente elucidado. Sugere-se que seria através da ação de algumas linhagens de bactérias presentes nesse ambiente que, juntamente com os agentes desencadeantes, como gliadina e IFN- γ , teriam resultados sobre os efeitos imunológicos da DC (ROSSI & SCHWARTZ, 2010).

Dessa forma, faz-se jus um estudo para investigar as diferenças entre a microbiota fecal de pacientes celíacos adultos e aqueles sem a doença, uma

vez que os estudos com adultos celíacos são escassos e, no Brasil, não há ainda dados relacionando o status da microbiota intestinal com a DC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia da DC

Historicamente, a DC era considerada uma doença que, predominantemente, acometia crianças e se manifestava, classicamente, pela perda de peso e diarreia por má-absorção (WGO, 2012).

Atualmente, entretanto, tem sido demonstrado que as manifestações da doença são mais variadas e cada vez mais comuns durante a fase adulta (BARTON *et al.*, 2007; PETEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2010). A ausência de sintomas em muitos casos e a ampla variabilidade de sua apresentação clínica (formas atípicas e silenciosas) levaram à equivocada conclusão de que a DC é uma condição rara. Como consequência, a maioria dos casos se manteve não diagnosticada e sua prevalência, subestimada.

Nos últimos anos, houve um aumento na prevalência da doença, em nível mundial, de 1:1000 para 1:100 (ERRICHELLO *et al.*, 2010), principalmente, devido ao seu melhor diagnóstico com o uso dos testes sorológicos de alta sensibilidade e especificidade, especialmente, os anticorpos antiendomísio (EMA) e antitransglutaminase tecidual (anti-tTG). Além disso, hoje o reconhecimento das desordens associadas e dos quadros clínicos suspeitos aumentou (PETER & GREEN, 2003; WGO, 2012; CHAND & MIHAS, 2006; PEREIRA, 2006). Ainda assim, acredita-se que a prevalência continue subestimada. O modelo, proposto por Logan (1991), conhecido como “*iceberg celíaco*” demonstra essa realidade, no qual, para cada caso diagnosticado, haveria muitos outros sem diagnóstico, por serem latentes, silenciosos, assintomáticos ou diagnosticados incorretamente (WGO, 2012).

Dados epidemiológicos recentes mostram que a DC afeta não só europeus e pessoas de ascendência europeia, mas também populações dos países em desenvolvimento (Oriente Médio, Sul da Ásia, África, América do Sul), onde sua prevalência é semelhante à dos países ocidentais. A origem e incidência de DC estão relacionadas a fatores genéticos, a migrações da humanidade e ao consumo de trigo (CATALDO, 2007).

A DC pode se manifestar em qualquer faixa etária, desde crianças a idosos. Os adultos celíacos, muitas vezes, não apresentavam durante a

infância nenhum sinal da doença. Segundo Vilppula *et al.* (2011), o número de diagnósticos em indivíduos idosos também está aumentando. Em três anos, a prevalência de DC diagnosticada por biópsia em pessoas acima de 55 anos aumentou de 2,13 para 2,34%. Já a DC, diagnosticada por biópsia somada à sorologia, foi de 2,45 para 2,70% (VILPPULA *et al.*, 2011).

Curiosamente, a prevalência é maior no sexo feminino em todo o mundo, com uma relação média de 2:1 (VOLTA & VILLANACCI, 2011).

No Brasil, o primeiro estudo epidemiológico, utilizando marcadores sorológicos, mostrou uma prevalência de DC de 1:681 entre doadores de sangue em Brasília – DF (GANDOLFI *et al.*, 2000). Alguns aspectos poderiam explicar essa prevalência relativamente baixa: (1) todos os doadores foram triados para a anemia, que é um sintoma frequente em pacientes celíacos; (2) no grupo estudado, a maioria dos doadores de sangue eram homens e é sabido que a DC é mais prevalente em mulheres (GANDOLFI *et al.*, 2000). Já em São Paulo, a prevalência comprovada por biópsia foi de 1:286 doadores (ALENCAR, 2007), revelando semelhança com a dos países europeus e EUA.

Atualmente, a DC é considerada uma das doenças genéticas mais comuns na Europa e nos Estados Unidos (CHAND & MIHAS, 2006) e, provavelmente, também no Brasil (GANDOLFI *et al.*, 2000).

2.2. Fisiopatologia da DC

O desenvolvimento da DC é um processo complexo que envolve a interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. A autoimunidade ocorre após a exposição aos fatores dietéticos desencadeantes (prolaminas) (BAPTISTA, 2006; SELIMOGLU & KARABIBER, 2010; ABADIE *et al.*, 2011).

A predisposição genética se relaciona aos alelos *Human Leucocyte Antigen* (HLA), particularmente, os haplótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (ARAÚJO, 2010). Quase todos os pacientes com DC expressam, pelo menos, um desses alelos; no entanto, o HLA-DQ2 é mais fortemente associado com a DC do que o HLA-DQ8. Como esses alelos são encontrados em 30 – 35% dos indivíduos saudáveis (KAGNOFF, 2007), sugere-se que eles contribuam para a doença, mas não sejam suficientes para provocar o seu desenvolvimento, o que reforça a importância da interação com outros fatores (ABADIE *et al.*, 2011). A exposição precoce ao glúten dietético é o principal fator ambiental que favorece a evolução da DC na infância (ROSSI & SCHWARTZ, 2010).

O mecanismo de ativação da doença inicia-se com a dificuldade de digestão proteolítica pelas enzimas gástricas, pancreáticas e da borda em escova no intestino delgado. Isso resulta no acúmulo de peptídeos relativamente grandes, com alto conteúdo de prolina e de glutamina no lúmen intestinal (KAGNOFF, 2005).

Os peptídeos não digeridos do glúten são capazes de causar um rearranjo no citoesqueleto celular através da ativação da via da zonulina, levando à perda das *tight junctions* que resulta em maior permeabilidade intestinal, permitindo a passagem paracelular destes peptídeos para a lâmina própria (VISSER *et al.*, 2009).

Ao atingirem à lâmina própria, a enzima transglutaminase tecidual (tTG) – enzima intracelular das células do epitélio intestinal – modifica estes peptídeos, convertendo os resíduos inicialmente neutros de glutamina em ácido glutâmico, que são carregados negativamente, por um processo chamado deamidação (VOLTA & VILLANACCI, 2011; CHAND & MIHAS, 2006; HOURIGAN, 2006). Há, então, a formação de novos epítomos com grande afinidade de ligação pelas moléculas de HLA-DQ2 /DQ8 (NIEWINSKI, 2008).

Quando as células T CD4⁺ reconhecem o complexo peptídeo – HLA-DQ nas células apresentadoras de antígenos (APCs) da mucosa intestinal há o desencadeamento da resposta imunológica adaptativa do tipo Th1, com liberação do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), interferon gama (INF- γ) e interleucina 21 (IL-21), que ativam as enzimas metil proteinases, cuja ação culmina em degradação da matriz celular e destruição das vilosidades dos enterócitos. Além disso, ocorre liberação também de prostaglandinas e tromboxanos, o que contribui para o processo inflamatório característico da DC (BRANSKI, 2012).

Concomitantemente, em menor grau, há o desencadeamento da resposta imunológica do tipo Th2, na qual os linfócitos B são estimulados a produzir anticorpos na forma de anti-gliadina, anti-transglutaminase IgA (anti-tTGA) e antiendomísio IgA (EMA). Ocorre também a ativação da resposta imunológica inata, com liberação de interleucina 15 (IL-15), responsável pela expressão dos receptores DC94 e NKG2D das células natural killer (NK), aumentando assim a citotoxicidade, a apoptose celular e a atrofia vilositária (BRANSKI, 2012; TRONCONE & JABRI, 2011).

A maior expressão de autoimunidade da DC é a presença de anticorpos séricos contra a enzima transglutaminase tecidual (tTG), que faz parte de uma grande família de enzimas transglutaminase, responsável por catalisar a formação de ligações isopeptídicas entre o grupo γ -carboxamida de resíduos de glutamina e o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina, em reação dependente de íons Ca^{+2} na região extracelular subepitelial da mucosa (CAJA *et al.*, 2011)

Todo esse processo é o que leva às alterações histológicas da DC, tais como, destruição e achatamento da superfície epitelial (HOURIGAN, 2006), infiltração linfocitária na mucosa do intestino delgado (duodeno e regiões do jejuno), atrofia das vilosidades intestinais com má digestão e absorção de nutrientes, além de outras manifestações clínicas de gravidade variável (NIEWINSKI, 2008; SELIMOGLU & KARABIBER, 2010; SILVA & FURLANETTO, 2010).

As mudanças típicas começam a ocorrer dentro de 4 – 6 horas de exposição aos peptídeos tóxicos (FRASER *et al.*, 2003). Embora as respostas possam ser variáveis e dependentes de uma série de fatores ainda não claramente identificados, está certo que o glúten, se reintroduzido em um momento posterior, levará à ocorrência de novas lesões na mucosa (ROBINS *et al.*, 2009).

2.3. Manifestações clínicas da DC

A apresentação clínica da DC varia amplamente, dependendo da idade do paciente, da duração e extensão da doença e da ausência ou presença de manifestações extraintestinais (CHAND & MIHAS, 2006).

Existem diferentes classificações da doença com base nessas manifestações. Para uma melhor compreensão, definiram-se cinco formas comuns de manifestação. (1) A forma clássica (ou típica) tem predomínio de má absorção intestinal. É sintomática e manifesta-se, principalmente, na primeira infância. (2) A forma não clássica (atípica) caracteriza-se por ausência de sintomas ou poucos sintomas gastrointestinais e presença de sintomas não gastrointestinais ou atípicos como, por exemplo, anemia por deficiência de ferro (SILVA & FURLANETTO, 2010). (3) A forma silenciosa ou assintomática, com ausência de sintomas, porém com presença de lesão intestinal característica, sorologia positiva e comprovadamente fundamentada entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, vem sendo reconhecida com maior

frequência nas últimas duas décadas (WGO, 2012; ARAÚJO, 2010). (4) A forma latente ou potencial, com histologia normal e sorologia positiva pode evoluir para doença celíaca ativa. (5) A forma refratária é representada pelos pacientes que não respondem à dieta isenta de glúten, sendo considerada a forma mais grave (SILVA & FURLANETTO, 2010).

As manifestações extraintestinais são bastante variadas e incluem: as alterações hematológicas, com sinal ou sintoma de anemia; as dermatológicas, pela presença de dermatite herpetiforme, desordem oral muco cutânea como as aftas; as disfunções neurológicas; as doenças hepáticas e endócrinas, tais como diabetes, doença da tireoide, osteopenia e osteoporose; além de câncer, redução da fertilidade e efeitos sobre a gestação (ARAÚJO, 2010).

2.4. Diagnóstico da DC

O denominador comum em todos os pacientes com DC é a presença da combinação variável entre manifestações clínicas dependentes de glúten, anticorpos específicos, presença dos haplótipos HLA-DQ2 e/ou DQ8 e diferentes graus de enteropatia, variando desde infiltração linfocitária até completa atrofia vilositária (TRONCONE & JABRI, 2011).

Desta forma, o amplo espectro dos sinais clínicos e a falta de especificidade dos sintomas, normalmente presentes em pacientes celíacos, fazem da DC uma condição de difícil diagnóstico (VOLTA & VILLANACCI, 2011; HOROWITZ, 2011). Salienta-se ainda que a proporção de indivíduos diagnosticados e não diagnosticados pode ser de 1:7 e, em torno de 10% dos casos, há discordância entre os achados sorológicos, clínicos e histológicos (SILVA & FURLANETTO, 2010).

A realização do diagnóstico é baseada em três vertentes: (1) relato dos sintomas e complicações, (2) presença de marcadores sorológicos específicos e (3) biópsia do intestino delgado (KAGNOFF, 2007).

Em 2012, a *World Gastroenterology Organization* (WGO, 2012) propôs um algoritmo com os procedimentos padrões para o diagnóstico da DC, baseado nestas três vertentes (Figura 1).

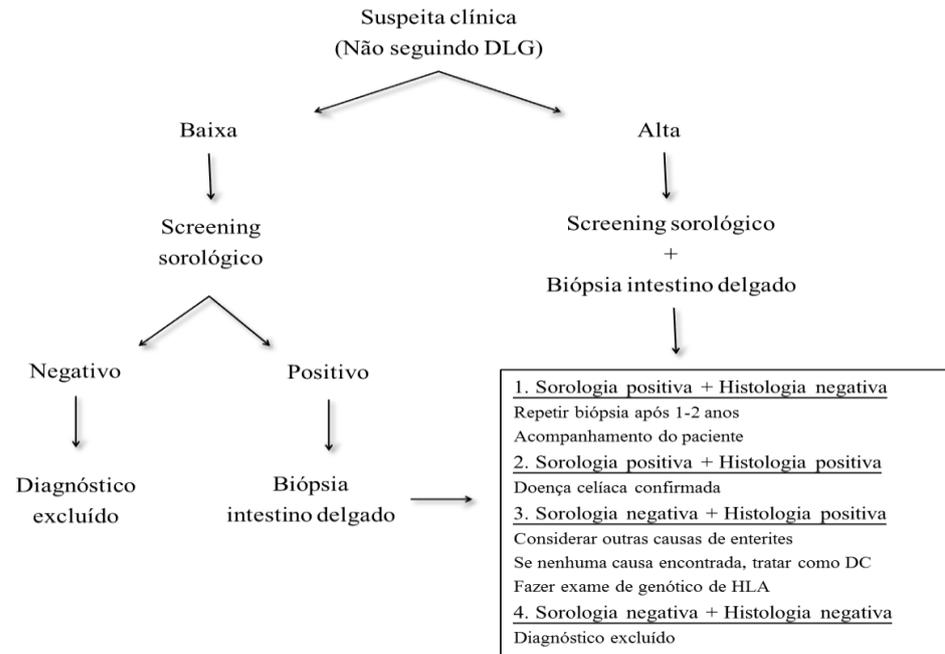


Figura 1 – Algoritmo para diagnóstico da DC, adaptado de WGO (2012).

Outra forma de se estabelecer o diagnóstico, denominada “4 out of 5 rules”, também tem sido relatada. Este método baseia-se na confirmação quando há presença de 4 dos 5 seguintes critérios: (1) apresentação dos sintomas típicos; (2) presença de resultado positivo para os anticorpos IgA específicos da DC em altos títulos; (3) presença dos genes que codificam os dímeros HLA-DQ2 ou DQ8; (4) presença de danos à mucosa intestinal característicos da DC, detectada por meio de biópsia do intestino delgado e (5) resposta positiva à DLG (HOROWITZ, 2011).

O início do diagnóstico pode ocorrer com a realização dos testes sorológicos (SILVA & FURLANETTO, 2010), os quais são utilizados para investigação de casos na evidência de sintomas gastrointestinais de má absorção (forma clássica), manifestações extraintestinais características (formas atípicas) e em indivíduos susceptíveis, ou seja, aqueles com parentes de primeiro grau com DC e em casos de anemia por deficiência de ferro, osteoporose e doença autoimune associada etc. (PICON & BELTRAME, 2009; SILVA & FURLANETTO, 2010, PRATESI & GANDOLFI, 2005).

Dessa forma, o screening sorológico da DC pode ser realizado por meio da detecção sérica dos anticorpos anti-gliadina (AGA), anti-endomísio (EMA), anti-transglutaminase tecidual – IgA (anti-tTG) e anti-peptídeos deamidados da gliadina (DGP) (WGO, 2012). A presença destes anticorpos em pacientes

celíacos está associada ao grau de atrofia vilositária (ZANINI *et al.*, 2012) e, possivelmente, também com o modo de apresentação da DC (GREEN, 2005). O anticorpo EMA é direcionado à enzima tTG no endomísio, tecido conjuntivo ao redor do músculo liso, sendo então reconhecido por predizer a progressão da atrofia de vilosidades (SILVA & FURLANETTO, 2010).

Vários estudos descreveram os diferentes anticorpos com objetivo de estabelecer qual o teste mais apropriado na detecção da DC (LEWIS & SCOTT, 2010; ROSTOM *et al.*, 2005), baseando-se na sensibilidade e especificidade destes em relação à biópsia intestinal (Quadro 1).

Quadro 1. Sensibilidade e especificidade dos principais anticorpos utilizados no screening sorológico da DC.

Anticorpo	Sensibilidade	Especificidade
AGA	75-95%	80-95%
EMA	80-97%	97-100%
tTG	85-98%	95-99%
DGP	74-98%	90-99%

Fonte: Adaptado de WGO (2009).

Atualmente, o AGA não é mais utilizado devido à sua baixa sensibilidade e especificidade em relação aos outros anticorpos (CAJA *et al.*, 2011).

O anticorpo anti-tTG apresenta-se como um marcador essencial na identificação dos indivíduos que deverão ser submetidos à biópsia intestinal e no acompanhamento da adesão à DLG, uma vez que a enzima tTG desenvolve um papel central no processo fisiopatológico da DC, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade (ROSTOM, 2005). Hopper *et al.* (2008), apesar de observarem alta sensibilidade para o anticorpo tTG, sugerem que a triagem sorológica para DC seja realizado em conjunto com o anticorpo EMA como forma de compensar o baixo valor preditivo negativo encontrado para o anticorpo tTG.

Em contrapartida, deve-se considerar que um percentual significativo de pacientes com DC apresentam deficiência da classe IgA de anticorpos, o que gera resultados falso-negativos (SILVA & FURLANETTO, 2010). Desta forma, concomitantemente aos exames de titulação dos anticorpos, deve-se realizar também a avaliação da IgA total nestes pacientes (BRANSKI, 2012). O

screening sorológico utilizando-se anticorpos IgG,(tanto o EMA IgG quanto o anti-tTG IgG), apesar de não ser tão específico para DC como os anticorpos IgA, constituem uma importante alternativa nos pacientes com deficiência de anticorpos IgA (HOROWITZ, 2011).

Cabe salientar que indivíduos com enteropatia sensível ao glúten podem ser excluídos na ausência dos anticorpos relacionados à DC e apenas aqueles com sorologia positiva devem ser submetidos à biópsia intestinal (VOLTA & VILLANACCI, 2011).

É imperativo que o tratamento com uma DLG não seja iniciado até que o diagnóstico esteja completamente estabelecido (ROBINS *et al.*, 2009), já que a exclusão do glúten pode mascarar os resultados.

A biópsia do intestino delgado proximal, em indivíduos positivos para os anticorpos específicos da DC e tipagem HLA, confirmam o diagnóstico. Este método é considerado o padrão-ouro para DC (VILLANACCI, ROSTAMI & VOLTA, 2010; KAGNOFF, 2007; RODRIGO, 2006). Porém, não é aconselhável definir o diagnóstico apenas a partir dos achados histológicos, uma vez que as alterações encontradas, apesar de características, não são exclusivas da DC (SILVA & FURLANETTO, 2010).

A lesão histológica característica da DC é a mucosa plana, com criptas alongadas e infiltrado linfocitário intraepitelial e na lâmina própria (LIONETTI & CATASSI, 2011). O diagnóstico final segue a classificação progressiva de Marsh (1992), adaptada por Oberhuber *et al.* (1999) (Quadro 2).

Apesar de características da DC, estas lesões intestinais também podem ser encontradas em outras doenças, como giardíase severa, sensibilidades alimentares infantis, isquemia crônica do intestino delgado e deficiências de imunoglobulinas (WGO, 2009).

Desta forma, devido às várias faces da DC que dificultam o reconhecimento da doença pelos profissionais de saúde, à falha em realizar os testes diagnósticos apropriados e à falta de um critério diagnóstico específico, fazem com que esta patologia permaneça não diagnosticada por longos períodos de tempo, aumentando a severidade das complicações (RODRIGO-SÁEZ, 2010).

Quadro 2. Classificação progressiva das lesões da mucosa do intestino delgado segundo critério de Marsh (1992).

Estágio	Nomenclatura	Características
0	Padrão pré-infiltrativo	Sem alterações histológicas.
1	Padrão infiltrativo	Aumento no número de linfócitos intraepiteliais (IELs) para mais de 30% dos enterócitos.
2	Hiperplasia de criptas	Em adição ao aumento das IELs, há aumento na profundidade das criptas sem redução da altura das vilosidades.
3	Atrofia vilositária	Clássica lesão celíaca. Presença de atrofia vilositária, hiperplasia de criptas e aumento do número de IELs. Subdivida em 03 categorias: A = pacial; B= subtotal; C = total.

Fonte: Adaptado de WGO (2009).

2.5. Tratamento da DC

Até o dado momento, o único tratamento cientificamente comprovado para a DC é a adesão a uma DLG, ao longo de toda a vida (HAINES, ANDERSON & GIBSON, 2008). Os pacientes, após a confirmação do diagnóstico, devem excluir da sua alimentação todos os cereais que contenham grandes quantidades de prolaminas (potencial tóxico), tais como trigo, centeio, cevada e seus derivados como, por exemplo, o malte (CHAND & MIHAS, 2006).

A inclusão da aveia, nessa relação, ainda é controversa. Alguns autores acreditam que a maioria dos adultos com DC possa consumir uma quantidade moderada de aveia sem causar dano à mucosa intestinal (THOMPSON, 2003). Além disso, segundo Kemppainen *et al.* (2010), o consumo de aveia pode aumentar a ingestão de alguns nutrientes (vitamina B1, zinco, ferro, magnésio e fibras) em pacientes celíacos em remissão, melhorando assim o valor nutritivo da DLG. Entretanto, a aveia pode ser contaminada durante o seu processamento e, como conseqüente, há um pequeno subgrupo de pacientes que não consegue tolerá-la. Nesses casos, o inchaço e o desconforto abdominal são as queixas mais frequentes (TRONCONE, AURICCHIO & GRANATA, 2008). Parece sensato adicionar aveia apenas quando a DLG já

estiver estabelecida, para que possíveis reações adversas possam ser identificadas no acompanhamento clínico de rotina (GARSED & SCOTT, 2007).

Destaca-se que muitos produtos industrializados e processados contêm o glúten como aditivo ou contaminante daquele processo e, potencialmente, poderiam afetar o estado nutricional caso não sejam substituídos por alternativas apropriadas e saudáveis (KINSEY, BURDEN & BANNERMAN, 2007). Entretanto, Thompson (2000), ao verificar a qualidade nutricional dos produtos sem glúten, concluiu que a maioria contém níveis mais baixos de tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico e ferro em comparação com os que continham trigo, talvez pelo fato de os produtos sem glúten, normalmente, não serem fortificados. Mais tarde, foi encontrada ingestão inadequada de ferro, fibras e cálcio em mulheres celíacas (THOMPSON *et al.*, 2005; ALVAREZ-JUBETE, ARENDT & GALLAGHER, 2009).

As propriedades visco-elásticas do glúten são responsáveis pela textura e gosto característicos dos produtos preparados com farinha de trigo (FERRETI *et al.*, 2012). Devido a estas propriedades, o glúten é utilizado não só em pães, biscoitos e massas, mas em uma grande variedade de alimentos, temperos, molhos, sopas instantâneas, carnes industrializadas, doces e até mesmo em preservativos, corantes, espessantes, emulsificantes e medicamentos (HOROWITZ, 2011; TJON *et al.*, 2010). Alternativas saudáveis ao glúten estão emergindo e não somente são isentos de glúten, como também são ricos em uma grande variedade de nutrientes (proteína, ferro, cálcio, fibras e outros), que poderiam melhorar o valor nutricional da DLG (ALVAREZ-JUBETE, ARENDT & GALLAGHER, 2009; LEE *et al.*, 2009). O Quadro 3 reúne alimentos que podem ser consumidos e utilizados em preparações livre de glúten.

Quadro 3. Alimentos substitutos do glúten.

Amaranto	Grão de bico	Sorgo
Araruta	Canjica	Soja
Trigo sarraceno	Algaroba	Fécula de mandioca
Milho	Painço	Farinha de ervilha
Fava	Quinoa	Farinha de batata
Linhaça	Sagu	Farinha de arroz

Fonte: Adaptado de Raymonds *et al.* (2006).

Na maioria dos casos, a DLG está associada ao desaparecimento dos sintomas clínicos e sinais sorológicos, à recuperação da histologia duodenal normal e à prevenção de complicações da DC. A reintrodução do glúten na dieta, em qualquer fase, faz com que haja a reativação dos sintomas clínicos, a não regeneração da lesão intestinal e o aumento dos níveis de anticorpos (TRONCONE, AURICCHIO & GRANATA, 2008). A melhoria desses marcadores com a retirada do glúten, muitas vezes, é exigida para a confirmação do diagnóstico preciso da doença (TRONCONE, AURICCHIO & GRANATA, 2008).

O impacto da má absorção de nutrientes, causada a partir da DC não tratada ou não diagnosticada em crianças e adultos, é bem documentado na literatura (KUPPER, 2005). A má absorção é comum na DC, devido a uma diminuição da área de absorção da mucosa e das enzimas digestivas da borda em escova do enterócito (SCHUPPAN *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que 20% a 38% dos pacientes com DC podem apresentar algumas deficiências nutricionais, tais como calorias totais e proteínas (BARDELLA *et al.*, 2000), fibra dietética (THOMPSON, 2000; THOMPSON *et al.*, 2005), ferro, magnésio, zinco e cálcio (RUDE & OLERICH, 1996; ANNIBALE *et al.*, 2001; OJETTI *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005), vitaminas do complexo B, principalmente B₁₂, niacina e riboflavina, ácido fólico e vitamina D (BARTON, KELLY & MURRAY, 2007; HALLERT *et al.*, 2009; SATURNI *et al.*, 2010).

Adicionalmente, alguns pacientes relatam outras intolerâncias e sensibilidades alimentares relacionadas, mais comumente, com os produtos lácteos em função da perda de lactase pelas alterações estruturais das mucosas. Entretanto, essas sensibilidades podem ser temporárias e resolvidas após a recuperação da mucosa intestinal, cujas restrições adicionais aumentam o risco geral de deficiências nutricionais (KUPPER, 2005; BARTON, KELLY & MURRAY., 2007).

Contudo, os pacientes celíacos não precisam saber apenas quais alimentos evitar, mas também como integrar a dieta livre de glúten à sua rotina. Assim, o sucesso da implementação e adesão à DLG está relacionada ao aprendizado dos indivíduos em relação à leitura dos rótulos de alimentos, ao conhecimento dos alimentos livres de glúten, além do conhecimento de

métodos que previnam a contaminação cruzada de alimentos e utensílios e, ainda, do manejo da dieta fora de casa (RAYMOND *et al.*, 2006).

2.6. Microbiota intestinal

Logo após o nascimento, micro-organismos iniciam a colonização do recém nascido e estabelece uma relação mútua com seu hospedeiro, a qual perdura por toda a vida, além de contribuir de forma essencial para a saúde e bem-estar do mesmo (DORÉ & CORTIER, 2010).

O hospedeiro desenvolve uma tolerância a bactérias não patogênicas que colonizam a superfície das mucosas e da pele. Por outro lado, as bactérias influenciam o desenvolvimento e a manutenção de inúmeras funções essenciais para o seu hospedeiro. A microbiota intestinal contribui para a bioconversão de compostos advindos da alimentação no trato superior do sistema digestório (DUARTE *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Ela exerce, ainda, um papel direto de colonização preventiva por meio da manutenção, em níveis populacionais reduzidos, de patógenos e os impedem de expressar virulência (WELLS, MADDAUS & SIMMONS, 1988).

É atualmente aceito que os micro-organismos, existentes ao longo do trato digestório humano, então conhecidos como microbiota, representam centenas de espécies em cada indivíduo. A densidade populacional microbiana, nesse complexo sistema, alcança seu valor máximo no cólon com 10^{11} bactérias por grama de conteúdo fecal (DORÉ & CORTIER, 2010).

Uma completa descrição de todas as bactérias intestinais não existe por duas principais razões: (1) os métodos tradicionais de cultura não contemplam mais do que 30% dos micro-organismos, já que a maioria deles é anaeróbica e de difícil cultura; (2) a diversidade das espécies de bactérias intestinais está subestimada (ECKBURG *et al.*, 2005).

Os gêneros cultiváveis da microbiota fecal dominante de adultos são *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* e *Bifidobacterium* (ECKBURG *et al.*, 2005). Quando a contagem de micro-organismos não cultiváveis não é possível em nível de espécie, os mesmos são analisados em um grau superior, a exemplo dos filos (grupos filogenéticos).

O filo Firmicutes é sempre altamente representado. Nesse, estão presentes em maior quantidade os grupos *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccoides*, que perfazem 14 a 31% do total de bactérias dependendo dos

estudos (SGHIR *et al.*, 2000). Constitui-se também de espécies pertencentes aos gêneros *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*. Como exemplo, existem as espécies *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, as quais são, comumente, dominantes (16 a 22% em média) (SGHIR *et al.*, 2000; FRANKS *et al.*, 1998).

Bacteroidetes são representados pelos gêneros relacionados aos *Bacteroides*. Eles estão sempre presentes e dividem dominância com o filo Firmicutes (9 a 42% do total de bactérias em média). Já o filo Actinobacteria é menos consistentemente detectado como dominante e representa um pequeno percentual do total de bactérias. O mesmo é composto pelas bifidobactérias (0,7 a 10%) e bactérias do grupo *Collinsella* – *Atopobium* (0,3 a 3,7% em média). Similarmente aos lactobacilos e streptococos, que pertencem ao filo Firmicutes e compreendem 2% do total de bactérias, as enterobactérias, pertencentes ao filo Proteobacteria, são também mais raramente observadas (0,4 a 1%) (SGHIR *et al.*, 2000; LAY *et al.*, 2005; FRANKS *et al.*, 1998).

O estado fisiológico da microbiota intestinal humana é chamado normobiose (DORÉ & CORTIER, 2010). A diversidade das espécies dominantes pode permanecer notavelmente estável, sendo que uma grande fração dessas espécies pode ser específica a um determinado indivíduo (VANHOUTTE *et al.*, 2004). Ainda assim, inúmeras observações consequentemente demonstram a habilidade da microbiota intestinal dominante em resistir a determinadas modificações. A administração de probióticos e/ou substratos exógenos não digeríveis e absorvíveis (prebióticos), frequentemente, leva a modificações momentâneas da composição da microbiota. Mesmo um estresse maior, como a administração de antibióticos, pode ser seguido pelo retorno da microbiota para seu perfil dominante inicial dentro de um mês, aproximadamente. Essa habilidade de restaurar seu padrão inicial, conhecida como resiliência, sugere uma sintonia de adaptação da microbiota, importante para o intestino e, até mesmo, para o hospedeiro que a abriga (DETHLEFSEN *et al.*, 2005; DE LA COCHETIÈRE *et al.*, 2005).

Numerosos fatores podem afetar a estabilidade das comunidades microbianas (disbiose). Os mais comuns são o trânsito intestinal, o pH, a quantidade e qualidade da dieta (DORÉ & CORTIER, 2010), além do uso de antibióticos (DETHLEFSEN *et al.*, 2008) e doenças que levam a alterações intestinais inflamatórias, como a DC (NADAL *et al.*, 2007).

A ingestão de glúten é o responsável direto pelos sintomas da DC. Entretanto, alteração na microbiota intestinal tem sido associada à apresentação dessa desordem ainda na infância. Como consequência, diferenças na composição dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico, principalmente), os quais são produtos do metabolismo microbiano e possuem atividade anti-inflamatória, também têm sido demonstradas em pacientes celíacos quando comparados com controles saudáveis (NADAL *et al.*, 2007; NISTAL *et al.*, 2012b; DI CAGNO *et al.*, 2009; COLLADO *et al.*, 2007).

Um estudo preliminar foi conduzido, a fim de estabelecer se a DLG seria capaz de modificar a composição e as propriedades imunes da microbiota intestinal (SANZ, 2010). Segundo a autora, práticas dietéticas para tratar doenças relacionadas à alimentação, a longo prazo, podem afetar a composição da microbiota residente e, desse modo, sua relação funcional com diversos tecidos e órgãos do hospedeiro. Além disso, a microbiota de pacientes sob DLG não é completamente reestabelecida em comparação com pacientes saudáveis. Foi encontrada uma redução da população bacteriana saudável (*Bifidobacterium*, *B. longum* and *Lactobacillus*), ao passo que a população de bactérias potencialmente prejudiciais aumentou com a redução de polissacarídeos na dieta (SANZ, 2010). Em particular, o aumento no número de *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae*, as quais são consideradas patógenos oportunistas, poderiam enfraquecer a defesa do hospedeiro contra infecções e inflamações crônicas e causar possíveis vias de alterações na imunidade da mucosa, proporcionando o desenvolvimento da DC.

Estudos em pacientes celíacos adultos ainda são escassos. Dessa forma, observa-se que sejam necessários novos estudos que caracterizem a microbiota intestinal de pacientes celíacos e a relacione com a produção de ácidos graxos de cadeia curta fecal e o consumo de fibras dietéticas.

3. OBJETIVO

Determinar a composição da microbiota intestinal e os ácidos graxos de cadeia curta de pacientes adultos portadores da DC e de um grupo comparativo saudável.

3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a população de portadores da DC quanto à antropometria, ingestão alimentar e características sócio-demográficas;
- Determinar e caracterizar a microbiota intestinal dos grupos em estudo;
- Determinar a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo fecal;
- Determinar o pH das fezes coletadas de ambos os grupos;
- Correlacionar a ingestão de nutrientes e a produção de ácidos graxos de cadeia curta com a microbiota fecal;
- Avaliar possíveis diferenças na microbiota, pH fecal e concentração de ácidos graxos de cadeia curta entre os grupos.

4. METODOLOGIA

4.1. Apresentação

Este trabalho é parte integrante do projeto intitulado “Avaliação nutricional, dos fatores de risco cardiovascular e da microbiota intestinal de adultos portadores de doença celíaca”, desenvolvido pelo Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFV sob o Of. Ref. nº 146/2011, de 10 de outubro de 2011 (Apêndice A).

Após esclarecimentos sobre os objetivos e metodologias da pesquisa todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B).

4.2. População do estudo

A população estudada foi composta por adultos portadores e não portadores de DC, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo de portadores de doença celíaca (GDC) e grupo de comparação (GCO), composto por indivíduos saudáveis. Estes foram pareados com os celíacos em relação à idade e sexo, na proporção de 2:1.

Como a prevalência da DC é desconhecida, a amostra foi obtida por conveniência. Os pacientes com diagnóstico de DC foram identificados em clínicas de gastroenterologia do município de Viçosa – MG e no programa de extensão PRO-CELÍACOS do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, cujo foco é o atendimento dos pacientes portadores de DC. A divulgação da pesquisa também foi realizada por meio de cartazes e anúncios na internet. Ao todo, 96 indivíduos foram identificados e contatados via telefone. Destes, 13 não foram localizados após 5 tentativas por meio de contato telefônico, em dias e horários alternados. Foram excluídos 63 indivíduos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão (Figura 1).

Após a coleta de dados do GDC, 40 indivíduos sem diagnósticos de doença celíaca foram recrutados, via cartazes e anúncios na internet. Os mesmos foram pareados com o GDC quanto à idade e ao gênero, considerando uma margem de 2 anos, para mais ou menos. Ao final, um

participante deste grupo foi excluído devido à impossibilidade de novo contato, totalizando, então, 39 indivíduos.

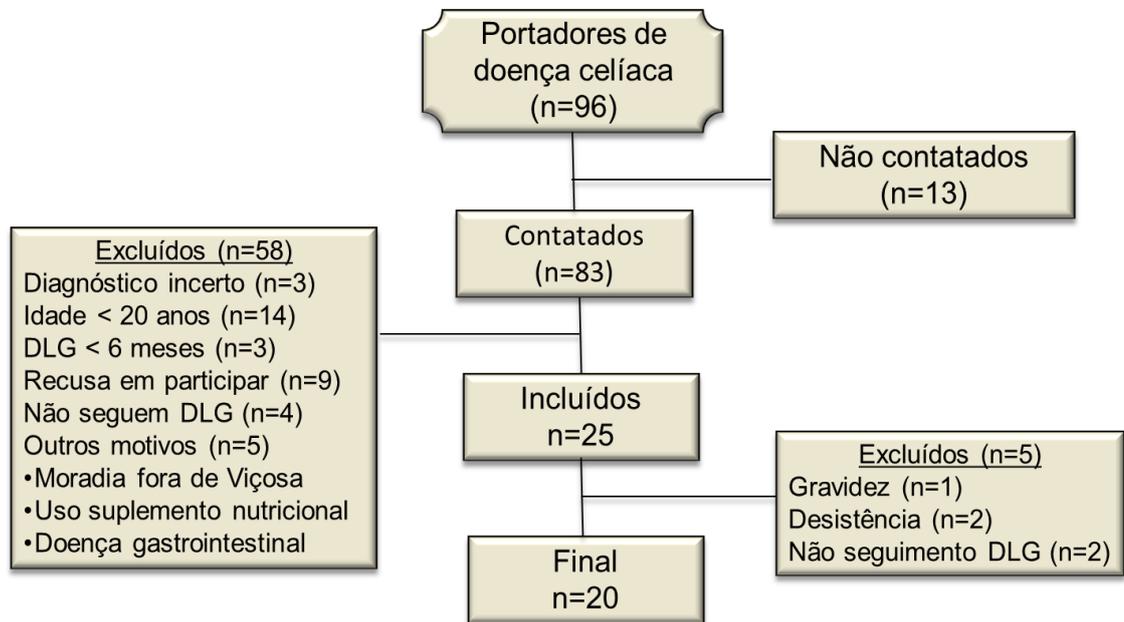


Figura 1. Fluxo de recrutamento e exclusão dos voluntários portadores de DC.

4.2.1. Critérios de inclusão

Para formar o GDC, foram incluídos indivíduos adultos, com idade entre 20 e 59 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de DC confirmado por meio de pelo menos uma biópsia da porção proximal do intestino delgado, mostrando anormalidades histológicas características da DC, conforme critério da *Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition* (WALKER-SMITH *et al.*, 1990), e que estavam seguindo o tratamento com DLG estrita há pelo menos 6 meses no momento do contato.

Para compor o GCO, foram convidados a participar indivíduos não portadores de doença celíaca, de acordo com o sexo e idade dos indivíduos já recrutados. Após concordância em participar do estudo, estes foram primeiramente submetidos ao teste sorológico anti-tTG, como forma de confirmar a exclusão da DC.

4.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do GDC indivíduos em uso ou que utilizaram suplementos nutricionais e/ou antibióticos nos últimos 03 meses, que apresentavam outras doenças intestinais inflamatórias diagnosticadas e/ou doenças que afetam a ingestão dietética normal, que não seguem a DLG por mais de 6 meses, além de gestantes e lactantes.

Do GCO, foram excluídos indivíduos que apresentaram sorologia positiva para DC, que apresentavam sintomas gastrointestinais recorrentes (náuseas, vômitos, diarreia e flatulência anormal), em uso ou que utilizaram suplementos nutricionais e/ou antibióticos nos últimos 3 meses, que apresentavam doenças intestinais inflamatórias diagnosticadas e/ou doenças que afetam a ingestão dietética normal, além também de gestantes e lactantes.

4.3. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional, de corte transversal, com grupo de comparação. A coleta de dados foi realizada de outubro de 2011 a março de 2012, na Divisão de Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

O procedimento para coleta de dados de ambos os grupos ocorreu em 3 encontros de acordo com Figura 2. A fim de assegurar a qualidade da coleta dos dados, todos os encontros foram realizados por nutricionistas previamente treinados em todas as metodologias utilizadas.

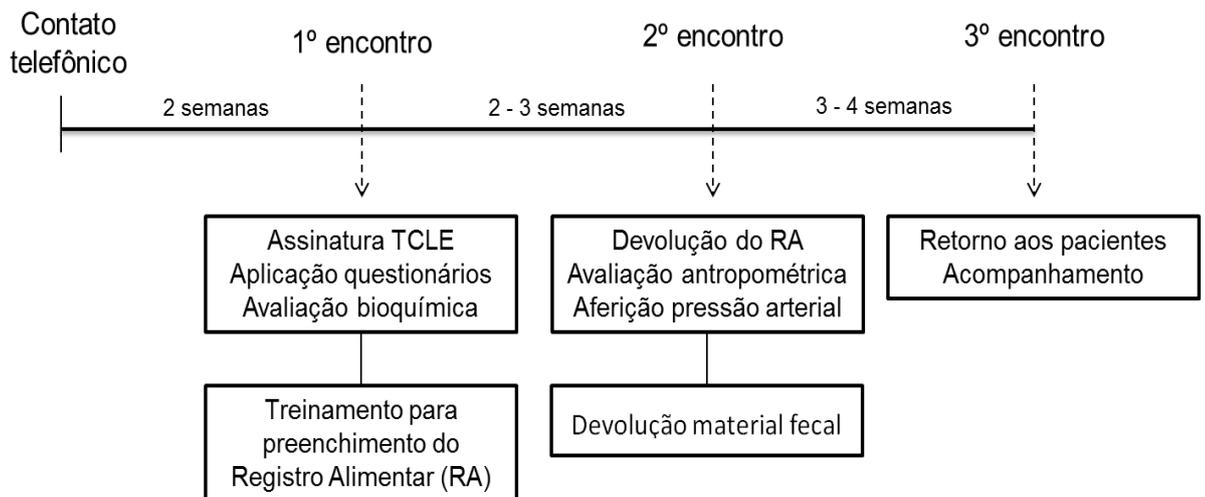


Figura 2. Procedimento adotado para a coleta de dados.

4.4 Métodos utilizados na coleta de dados

4.4.1. Questionários

Foram utilizados 2 questionários para a coleta de dados:

▪ Questionário Geral: composto por questões relacionadas ao nível socioeconômico, ao histórico social, ao histórico da doença celíaca, à história clínica e aos hábitos alimentares (Apêndice C). As variáveis compreendidas neste questionário foram:

- Sexo;
- Idade;
- Classe social: utilizou-se o Critério de Classificação Econômico desenvolvido pela ABEP, Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP, 2011). Por meio do somatório de pontos, classifica-se os voluntários nas classes sociais A1, A2, B1, B2, C1, C2, D e E. Para as análises posteriores, as classes A1, A2, B1 e B2 foram agrupadas na categoria AB enquanto as classes C1, C2, D e E foram agrupadas na categoria CDE;
- Escolaridade: avaliada em relação a anos de estudo;
- Raça;
- Tabagismo;
- Etilismo;
- Frequência do consumo de bebidas alcoólicas;
- Quantidade de bebida alcoólica consumida, calculada em gramas de etanol por dia. De acordo com o relato da quantidade e tipo de bebida alcoólica consumida pelos participantes do estudo, a quantidade de etanol referente a esta quantidade foi calculada, utilizando-se o teor alcoólico de cada bebida (Quadro 1).

Quadro 1. Teor alcoólico (v/v) das bebidas consumidas pelos participantes do estudo

Vinho – 13%	Cerveja – 4,5%
Ice – 5,5%	Cachaça – 45%
Vodka – 45%	Champagne – 11%
Whisky – 40%	

Como o relato das quantidades consumidas foram realizadas em medidas caseiras, fez-se a padronização destas medidas (Quadro 2). Sendo assim, a quantidade de etanol consumida foi calculada pela multiplicação da quantidade da bebida consumida pelo seu teor alcoólico. Em seguida, realizou-se uma regra de três de acordo com o relato da frequência de consumo para encontrar a quantidade de etanol consumida em 1 dia. No caso de indivíduos que relataram consumir mais de um tipo de bebida, utilizou-se a média da quantidade de etanol consumido.

Quadro 2. Padronização das medidas caseiras de consumo de bebidas alcoólicas

Medida caseira	Quantidade correspondente
Copo de cerveja	150 mL
Garrafa de cerveja	600 mL
Garrafa de vinho	750 mL
Taça de vinho	130 mL
½ taça de vinho	60 mL
Garrafa de Ice	275 mL
Dose de bebida destilada	40 mL
Lata de cerveja	350 mL
Garrafa de champagne	750 mL

Outros fatores também foram considerados, como:

- Intolerância à lactose;
- Hipertensão arterial sistêmica;
- Hipertrigliceridemia;
- Hipercolesterolemia;
- Infarto agudo do miocárdio;
- Familiar com DCV. Considerou-se como DCV o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular encefálico, a angioplastia com implantação de Stent, além dos fatores de risco, como diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemias e obesidade;
- Grau de parentesco do familiar com DCV. Considerou-se pai e mãe como parentes de 1º grau; avós e irmãos como de 2º grau; tios, sobrinhos e bisavós de 3º grau; e de 4º grau, sobrinho-neto e primos. Para as análises

posteriores, os indivíduos foram agrupados em duas categorias: 1º grau = indivíduos que possuíam pelo menos um parente de 1º grau com alguma das DCVs consideradas anteriormente; \geq 2º grau = aqueles que possuíam parentes de 2º grau ou mais e que não possuíam parentes de 1º grau com algumas das DCVs consideradas anteriormente.

- Menopausa;

- Reposição hormonal, para as mulheres pós-menopausadas, que possuíam prescrição média para uso de medicamento para reposição hormonal;

- Uso de medicamentos;

- Descrição dos medicamentos utilizados;

- Tempo de diagnóstico da DC;

- Presença de sintomas antes do diagnóstico;

- Sintomas relatados antes do diagnóstico da DC;

- Tempo de seguimento da DLG;

- Acompanhamento nutricional da DLG;

- Frequência do acompanhamento nutricional.

- Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): foi utilizada a versão curta do IPAQ, versão 8.0, validado para a população brasileira, por MATSUDO et al. (2001) (Apêndice D). Para determinar o nível de atividade física (AF) dos voluntários, levou-se em consideração o tempo de AF realizada na semana anterior à entrevista, calculando-se o escore de AF, por meio da soma do tempo gasto com AF de intensidade moderada e caminhada com o tempo gasto com AF vigorosas, multiplicado por dois [AF = AF_{moderadas} + Caminhadas + (AF_{vigorosas} x 2)] (PATE et al., 1995). Os indivíduos que obtiveram escore \geq 150 minutos de AF foram classificados como fisicamente ativos e aqueles com escore $<$ 150 minutos de AF, como irregularmente ativos.

4.4.2. Determinação do anticorpo anti-tTG

Foram coletados 5 mL de sangue, por punção venosa da veia anticubital, após 12 horas de jejum, em tubo soro-gel, de todos os participantes do estudo, por profissional bioquímico capacitado, do Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, para

posterior análise do anticorpo anti-tTG, a qual foi realizada no Laboratório Álvaro – PR, por meio do método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA.

4.4.3. Avaliação do consumo de macronutrientes e fibras

A ingestão dietética atual foi avaliada utilizando-se registros alimentares (RA) de três dias não consecutivos, o qual abrangia dois dias de semana e um dia de final de semana.

Todos os voluntários receberam um treinamento prévio ao seu preenchimento, com orientações verbais e escritas (Apêndice E), além de registros fotográficos para facilitar a estimativa das porções. Os voluntários foram orientados a não modificar seu padrão alimentar habitual e a anotar todos os alimentos e bebidas consumidos durante os dias escolhidos, inclusive aqueles ingeridos fora de casa, de maneira detalhada (marca e modo de preparo), em medidas caseiras. Como as receitas caseiras e os produtos industrializados livres de glúten não estão incluídos nas tabelas de composição de alimentos utilizadas, os participantes foram instruídos a fornecer o rótulo dos alimentos consumidos (FISBERG *et al.*, 2005).

Após um tempo estipulado de 2 a 3 semanas do treinamento, os voluntários foram novamente contatados para devolução dos RA. Todos os registros foram revisados, por nutricionista experiente, juntamente com o voluntário, para reduzir os erros inerentes ao método.

Para a conversão, em gramas, das quantidades relatadas em medidas caseiras, utilizou-se a Tabela para Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO *et al.*, 2005). Na ausência de informações, utilizou-se como opção um material desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, intitulado “Avaliando o Consumo Alimentar” (SALES *et al.*, 2009) e o livro “Consumo Alimentar – Visualizando Porções” (MONTEIRO *et al.*, 2007). Caso o alimento relatado não fosse encontrado nestes materiais, procurou-se informações sobre o tamanho das porções descritas nos rótulos dos produtos industrializados ou, em último caso, estimado o peso a partir de outro alimento semelhante.

As análises foram realizadas no *software Avanutri PC Revolution, versão 4.0*, sendo utilizada preferencialmente a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2006). Caso o alimento não fosse encontrado nessa tabela,

utilizou-se preferencialmente o alimento contido na versão 4.0 da mesma tabela (2011), uma vez que esta versão atualizada ainda não se encontra disponível para este software. Quando o alimento não foi encontrado nestas tabelas, utilizou-se a tabela do IBGE (2011) ou as informações nutricionais contidas nos rótulos dos alimentos.

O grau de confiabilidade das informações dos RAs em relação à subestimação e superestimação dos dados foi avaliado dividindo-se o valor calórico da dieta (VCT) consumido (obtido através da quantificação energética dos macronutrientes: carboidrato, proteína e lipídio) pela EER, necessidade energética estimada (VET:EER). Considerou-se que houve subestimação da ingestão energética quando os valores dessa razão foram $< 1,2$ (WAHRLICH & ANJOS, 2001). Ao final, 18 voluntários do GDC e 37 do GCO entregaram corretamente os registros alimentares.

A EER foi calculada de acordo com o *Institute of Medicine* (2002). As equações para cálculo da EER foram:

- Gênero masculino:

$$\text{EER} = 662 - 9,53 \times \text{Idade (anos)} + \text{NAF} \times [(15,91 \times \text{Peso (kg)}) + 539,6 \times \text{Altura (m)}]$$

- Gênero feminino:

$$\text{EER} = 354 - 6,91 \times \text{Idade (anos)} + \text{NAF} \times [(9,36 \times \text{Peso (kg)}) + 727 \times \text{Altura (m)}]$$

Considerou-se como nível de atividade física (NAF) dos indivíduos os resultados obtidos pela classificação do IPAQ, segundo Matsudo et al (2001), sendo estes aproximados do NAF proposto pelo IOM (2002) (Quadro 3).

Quadro 3. Níveis de atividade física (NAF) para cálculo da EER de acordo com a classificação do IPAQ

IPAQ sedentário → NAF = 1.0 para ambos os gêneros

IPAQ irregularmente ativo A ou B → NAF = 1.11 para homens e 1.12 para mulheres

IPAQ ativo → NAF = 1.25 para homens e 1.27 para mulheres

IPAQ muito ativo → NAF = 1.48 para homens e 1.45 para mulheres

4.4.4. Avaliação antropométrica e da composição corporal

Para a avaliação antropométrica, obteve-se as medidas de peso, estatura, perímetro da cintura e do quadril. A partir destes dados construíram-

se relações como índice de massa corporal (IMC) e relação cintura/quadril (RCQ). As medidas foram obtidas por nutricionistas experientes, previamente treinados.

- **Peso:** obtido em balança digital eletrônica, com capacidade de 150 kg e precisão de 50 g. Os voluntários usavam roupas leves, sem adornos e sem objetos que pudessem interferir nesta avaliação (WHO, 1995).

- **Estatura:** aferida por meio de antropômetro vertical, dividido em centímetros e subdividido em milímetros. Para tal, os indivíduos encontravam-se descalços e com os calcanhares unidos, com o corpo em contato com o equipamento (WHO, 1995).

- **IMC:** calculado a partir da divisão do peso, em quilograma, pelo quadrado da estatura, em metros. Os pontos de corte utilizados encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4. Pontos de corte e classificação do estado nutricional segundo índice de massa corporal (IMC).

IMC (kg/m ²)	Classificação
< 18.5	Baixo Peso
18.5 – 24.9	Eutrofia
25.0 – 29.9	Sobrepeso
30.0 – 34.9	Obesidade grau I
35.0 – 39.9	Obesidade grau II
> 40.0	Obesidade grau III

Fonte: adaptado de WHO (2000).

- **Perímetro da cintura:** aferido utilizando-se fita métrica inelástica, com limite de 2 metros, subdividida em centímetros e milímetros. A aferição foi realizada no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela (WHO, 2008). Os pontos de corte utilizados encontram-se no Quadro 7.

- **Perímetro do quadril:** aferida utilizando-se fita métrica flexível e inelástica com limite de 2 metros, subdividida em centímetros e milímetros. A medida foi obtida na maior proeminência da região glútea (WHO, 2008).

- **Relação cintura/quadril (RCQ):** calculada a partir da divisão do perímetro da cintura pelo perímetro do quadril ambos em centímetros (WHO, 2008). Os pontos de corte utilizado encontram-se no Quadro 5.

Quadro 5. Pontos de corte e risco de complicações metabólicas em relação ao perímetro da cintura, perímetro do quadril e relação cintura quadril.

	Ponto de corte		Risco de complicações metabólicas
	Masculino	Feminino	
Perímetro da cintura	> 94 cm	> 80 cm	Aumentado
	> 102 cm	> 88 cm	Aumentado substancialmente
Relação cintura/quadril	≥ 0.90	≥ 0.85	Aumentado substancialmente

Fonte: adaptado de WHO (2008).

A composição corporal foi realizada por meio da técnica de absorciometria por dupla emissão de raio X (Dual-Energy X-ray Absorptiometry – DEXA) mediante scaneamento de corpo inteiro em equipamento Lunar Densitometry GE®; software Encore, versão 13.3.

Dos resultados obtidos, utilizou-se para análise o percentual de gordura corporal total e a quantidade de gordura na região androide. Os pontos de corte para o percentual de gordura corporal encontra-se no Quadro 6.

Quadro 6. Pontos de corte e classificação do percentual de gordura corporal

	Pontos de corte	
	Masculino	Feminino
Eutrofia	12 – 20%	20 – 30%
Limite	21 – 25%	31 – 33%
Obesidade	> 25%	> 33%

Fonte: Adaptado de Bray *et al.* (1998).

4.4.5. Aferição da pressão arterial

A aferição da pressão arterial foi realizada por único avaliador treinado, por método indireto, utilizando-se esfigmomanômetro aneróide e manguito, adequados à circunferência braquial de cada voluntário, segundo metodologia da VI Diretriz Brasileira de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2010).

Foram registradas as pressões sistólica (PAS) e diastólica (PAD), correspondentes às fases I e V dos sons de Korotkoff, respectivamente. Primeiramente foram aferidas as pressões de ambos os braços e, em caso de diferença, foi utilizado como referência para as medidas subsequentes o braço com o maior valor.

Foram realizadas três medidas com intervalo de um minuto entre elas, sendo a média das duas últimas consideradas a pressão arterial real. Caso as pressões sistólicas e/ou diastólicas obtidas apresentassem diferença maior que 4 mmHg entre as medidas, estas eram realizadas novamente até fossem obtidas com diferença inferior.

Os pontos de corte utilizados para avaliação destes parâmetros estão apresentados no Quadro 7.

Quadro 7. Pontos de corte utilizados na avaliação da pressão arterial em adultos.

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Fonte: Adaptado da SBC (2010).

4.4.6. Caracterização de grupos de micro-organismos da microbiota fecal

A microbiota intestinal foi analisada por meio do método *fluorescent in situ hybridization* – FISH, descrito por Grzeškowiak *et al.* (2012). Brevemente, as amostras de fezes foram pesadas (500 mg), diluídas (1:10) em tampão fostato (pH 7,4) e agitadas em vórtex. Alíquotas (500 µL) foram fixadas *overnight* em paraformaldeído, a 4%, e estocadas em etanol-PBS, a 4°C, até análise. O método de FISH seguido de sua leitura em citômetro de fluxo foi realizado de acordo com Collado *et al.*, 2008. As amostras foram hibridizadas em solução hibridizadora, com sondas específicas na concentração de 50 ng/µL e, então, lavadas com PBS e estocadas a -20 °C, até análises. A sonda *Eubacterium* (EUB) 338 foi ligada covalentemente na terminação 5' com carbocianina – Cy5 (Genone®) e as outras, com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As sondas incluídas foram: EUB338, EUB338 II e EUB338 III, para o total de bactérias; Bif164, para o grupo *Bifidobacterium*; Lab158, para os grupos *Lactobacillus* e *Enterococcus*; Bac303, para os grupos *Bacteroides* e *Prevotella*; Chis150 para o grupo *Clostridium histolyticum*; Enter1432, para o grupo *Enterobacterium*, incluindo *Escherichia coli* (COLLADO *et al.*, 2008). Os

dados foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson[®], San Jose, CA, USA), no Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto – MG, e analisados em software BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson[®]).

4.4.7. Identificação e quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta

A extração e determinação da concentração dos AGCC no conteúdo fecal foram realizadas de acordo com a técnica descrita por Teixeira e colaboradores (2013), com algumas modificações. Amostras de fezes (400mg) foram misturadas a 900 µL de solução de ácido meta-fosfórico, a 25%, e mantidas em repouso, em temperatura ambiente, durante 30 minutos, em Eppendorf. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (microcentrífuga refrigerada, HERMLE Z 216MK; Hermle Labortechnik) a 13500 rpm, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. Esse procedimento foi realizado três vezes. Os ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) foram determinados em cromatógrafo Shimadzu[®], série 17A, equipado com detector de ionização de chama e coluna Nukol (30m x 0.25 mm, Supelco[®]), no Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa – MG. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste e o fluxo na coluna foi de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 220 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C e mantida por 5 minutos, elevando-se a 10 °C por minuto até atingir 185 °C. As amostras foram injetadas (1µL) por meio de seringa Hamilton[®] de 10 µL. O tempo de corrida total foi de 33,5 min. Os dados foram expressos em µmol/g.

4.4.8. Determinação do pH fecal

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado por meio de pHmetro (Instrutherm[®], modelo PH-1900). Para tal, foi utilizado 1 g de fezes diluídas em 50mL de água milli-Q. Após homogeneização, foi realizada a leitura do pH.

4.4.9. Retorno aos pacientes

O retorno aos voluntários foi constituído do fornecimento dos resultados das avaliações antropométricas, de composição corporal e dietética, através de

um relatório nutricional, que também continha orientações nutricionais (Apêndice F).

Os voluntários do GDC receberam um folder educativo (Apêndice G), desenvolvido pela Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil (FENACELBRA), sobre alimentação saudável na doença celíaca (SANTOS, 2011). Ainda, todos foram encaminhados para o programa de extensão PRO-CELÍACOS, do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, independente da necessidade de acompanhamento nutricional, uma vez que esse programa fornece oficinas e atividades em grupos para esta população.

Os indivíduos do GCO, que apresentaram alterações nas avaliações realizadas, foram orientados e acompanhados pelos pesquisadores. Estes também recebem um folder sobre alimentação saudável produzido por um dos pesquisadores do estudo (Apêndice H).

4.4.10. Análises estatísticas

O banco de dados foi digitado no *Microsoft Excel* e as análises estatísticas foram realizadas no software *Intercooled Stata 9.0 for Windows*.

Os dados são apresentados com medidas de tendência central e dispersão. Os testes paramétricos e não paramétricos foram aplicados de acordo com a distribuição das variáveis de interesse.

- *Teste de Shapiro-Wilk*: aplicado para as variáveis quantitativas para testar sua distribuição na curva de Gauss. O valor de $p > 0,05$ definia aquelas variáveis com distribuição normal.

- *Teste t de Student*: utilizado para comparar dois grupos independentes, cujas variáveis apresentam distribuição normal;

- *Teste de Mann-Whitney*: utilizado para comparar dois grupos independentes, cujas variáveis não apresentam distribuição normal;

- *Teste do qui-quadrado*: utilizado para verificar associação entre duas variáveis categóricas;

- *Teste exato de Fisher*: utilizado para verificar associação entre duas variáveis categóricas quando o valor esperado em alguma casela na tabela 2x2 é menor que 5.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da População

Participaram do estudo 59 indivíduos, sendo 20 portadores de DC e 39 não portadores de DC, do município de Viçosa – MG. A média de idade do GDC foi de $36,3 \pm 13,7$ anos e do GCO, $36,0 \pm 12,9$ anos ($p=0,948$). Houve maior prevalência da faixa etária de 20 a 29 anos (49,1%). Em ambos os grupos, a maioria dos participantes era do sexo feminino (64,4%) (Figura 1).

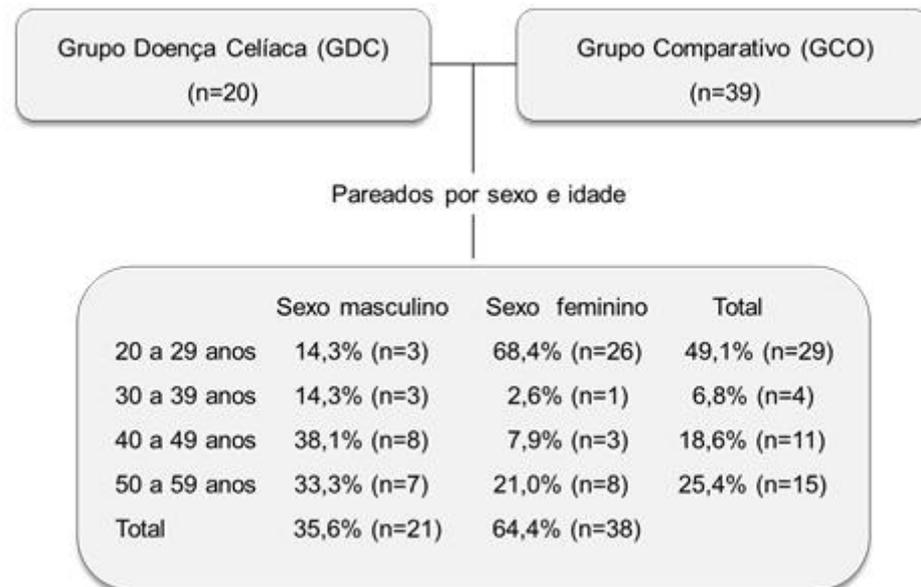


Figura 1. Caracterização da população estudada segundo sexo e faixa etária.

Em relação à classe social, 88,9% ($n=16$) e 11,1% ($n=2$) dos pacientes celíacos e 69,2% ($n=27$) e 30,7% ($n=12$) dos indivíduos do GCO pertenciam à classe social AB e CDE, respectivamente. Não houve, no entanto, diferença significativa entre os grupos ($p=0,185$).

No que tange à escolaridade, nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p=0,096$) foi observada. A média de anos de estudo do GDC foi de $14,1 \pm 4,7$ anos (variando de 4 a 22,5 anos) e do GCO, de $16,3 \pm 5,0$ (variando de 4 a 26,6 anos).

A maioria dos indivíduos do GDC e do GCO se autodeclarou da raça branca (75% vs. 71,8%, respectivamente), enquanto o restante se autorreferiu como de raça parda (25% vs. 28,2%, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,794$).

No tocante às características sociais e de hábitos de vida dos pacientes celíacos, 100% não eram tabagistas, 60% relataram consumir algum tipo de bebida alcoólica, sendo que a maioria destes (58,3%) apresentou baixa

frequência de consumo (< 1 vez/semana) (Tabela 1). Apenas 2 indivíduos (22,2%) do GDC consumiram quantidades de álcool acima do recomendado, não havendo diferença entre os grupos ($p=0,191$).

Tabela 1. Hábitos de vida segundo presença ou ausência da DC, Viçosa-MG, 2013.

Variáveis	GDC (n=20)	GCO (n=39)	<i>p</i>
Tabagismo			
Não fumante	20 (100%)	33 (84,6%)	0,064
Fumante	-	6 (15,4%)	
Etilismo			
Não	8 (40%)	10 (25,6%)	0,257
Sim	12 (60%)	29 (74,4%)	
Quantidade de etanol consumida por dia (g)	11,5±16,3	56,7±277,7	0,705
Frequência de etilismo			
≥ 1 vez/semana	5 (41,7%)	21 (72,4%)	0,063
<1 vez/semana	7 (58,3%)	8 (27,6%)	
Atividade física			
Irregularmente ativo	18 (90%)	27 (69,2%)	0,076
Fisicamente ativo	2 (10%)	12 (30,8%)	

* Teste Qui-quadrado.

Quanto à atividade física, os pacientes celíacos apresentaram uma tendência a serem mais irregularmente ativos (Tabela 1). Os indivíduos do GDC relataram ficar sentados em média 5,2±2,9 horas em dias de semana e 6,8±4,1 horas em fins de semana. Já os indivíduos do GCO relataram passar 6,3±3,2 horas sentados em dias de semana e 6,0±3,5 horas em fins de semana. Não houve diferença entre os grupos ($p=0,207$ e $p=0,442$, respectivamente).

Não houve diferença entre os grupos em relação à história clínica, com exceção da presença de intolerância à lactose, que se associou com a presença de DC (Tabela 2).

Tabela 2. Características da história clínica de acordo com a presença ou ausência de DC, Viçosa-MG, 2013.

História clínica ^a	GDC (n=20)	GCO (n=39)	P
Intolerância à lactose			
Não	8 (40%)	39 (100%)	0,000*
Sim	12 (60%)	-	
Hipertensão arterial			
Não	18 (90%)	37 (94,9%)	0,598
Sim	2 (10%)	2 (5,1%)	
Hipertrigliceridemia			
Não	17 (85%)	37 (94,9%)	0,325
Sim	3 (15%)	2 (5,1%)	
Hipercolesterolemia			
Não	18 (94,7%)	38 (97,4%)	1,000
Sim	1 (5,3%)	1 (2,6%)	
Infarto agudo do miocárdio			
Não	19 (95%)	38 (97,4%)	1,000
Sim	1 (5%)	1 (2,6%)	
Familiar com DCV ^b			
Não	3(15%)	8 (20,5%)	0,734
Sim	17 (85%)	31 (79,5%)	
Grau de parentesco do familiar com DCV			
1º grau	14 (82,5%)	24 (75%)	0,725
≥ 2º grau	3 (17,6%)	8 (25%)	
Menopausa ^c	3 (15%)	6 (15,4%)	1,000
Reposição hormonal	2 (66,7%)	-	-

^aTodas as doenças foram diagnosticadas antes da DC; ^bDCV = doença cardiovascular. ^cMenopausa foi considerada para mulheres acima de 45 anos. * Teste exato de Fisher, $p < 0,05$ significância estatística.

Em relação ao uso de medicamentos, 55% (n=11) dos pacientes celíacos relataram fazer uso de algum medicamento, sendo citados aqueles para tratamento de distúrbios da tireóide (18,2%), de refluxo gastroesofágico (45,4%), depressão (63,6%), anti-hipertensivos (27,3%), antilipemiantes (9,0%) e anticoncepcional (18,2%).

Sobre a história da DC, os pacientes celíacos apresentaram um tempo de diagnóstico médio de $1,2 \pm 0,7$ anos (variando de 6 meses a 3 anos), sendo que 95% destes (n=19) apresentavam sintomas antes do diagnóstico. O mais relatado foi o mal estar geral (65%), caracterizado por fadiga intensa, sensação de tonteira e dores pelo corpo (Figura 2).

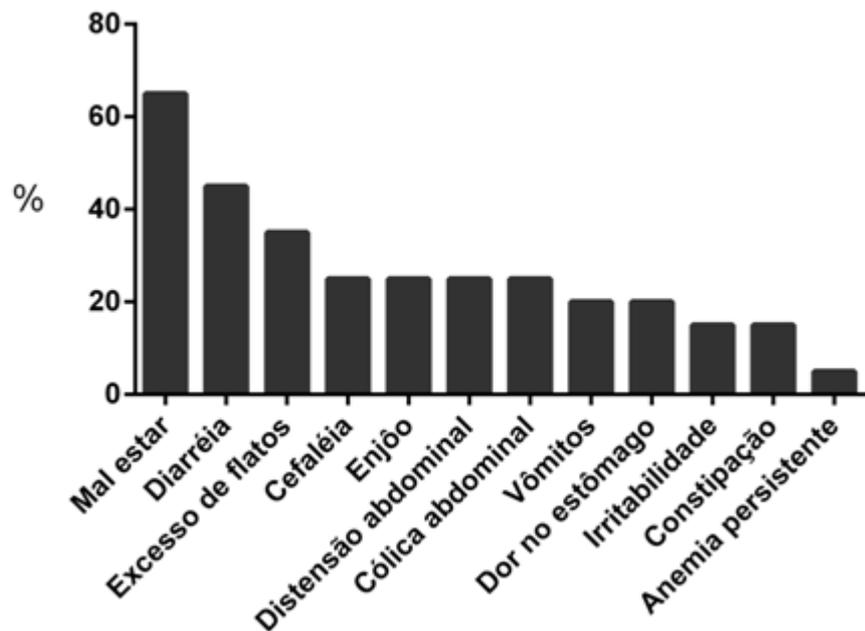


Figura 2. Principais sintomas relatados pelos pacientes celíacos e proporção de indivíduos que os apresentaram antes do diagnóstico da DC, Viçosa-MG, 2013.

O tempo de seguimento da DLG foi idêntico ao tempo de diagnóstico ($1,2 \pm 0,7$ anos, variando de 6 meses a 3 anos), o que demonstra que estes pacientes iniciaram o tratamento imediatamente após a confirmação do diagnóstico. Acerca do acompanhamento nutricional, 60% ($n=12$) relataram não realizar nenhum tipo de acompanhamento. Entre aqueles que o realizavam (40%, $n=8$), 75% ($n=6$) referiram acompanhamento mensal, 12,5% ($n=1$) bimestral e 12,5% ($n=1$) anual.

A respeito do exame do resultado do anticorpo anti-tTG, somente 2 pacientes do GDC apresentaram valores alterados. Por esse motivo, foram excluídos da amostra, uma vez que esse é um indicativo de não seguimento da DLG. Todos os indivíduos do GCO tiveram resultado negativo para o anticorpo.

Com relação à ingestão alimentar, nenhum paciente apresentou superestimação ou subestimação da ingestão calórica. Os grupos não se diferiram quanto ao consumo de carboidrato, proteína, lipídeo e fibras (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo alimentar de acordo com a presença ou ausência de DC, Viçosa-MG, 2013.

Nutrientes	GDC (n=18)	GCO (n=37)	P
Ingestão calórica (Kcal)	1977,6± 260,8	2084,6± 336,5	0,085
Carboidratos (% IC)	51,0±9,3	52,5± 5,5	0,460
Proteínas (% IC)	16,2±4,2	16,5±3,4	0,784
Lipídios (% IC)	31,7±7,3	30,2± 3,8	0,971
Fibras (g)	18,0±5,1	17,8±6,4	0,666

IC = ingestão calórica; * Teste t de Student, $p < 0,05$ significância estatística.

A média dos valores de EER calculados para ambos os grupos foram 2392,0±413,1 kcal para o GDC e 2549,1±435,7 kcal para o GCO, não havendo diferença entres os grupos ($p=0,255$).

Comparando-se os grupos em relação às variáveis antropométricas e de composição corporal foi possível observar que os pacientes celíacos apresentaram menor peso (61,3±11,8 kg vs. 68,8±11,8 kg, $p=0,024$), altura (1,6±0,1 m vs. 1,7±0,1 m, $p=0,020$) e perímetro do quadril (92,3±6,5 cm vs. 97,3±5,6 cm, $p=0,004$) em comparação com o GCO. Porém, não houve diferença em relação ao IMC (22,5±3,2 kg/m² vs. 23,8±3,7 kg/m², $p=0,305$) e à relação cintura-quadril (0,8±0,1 vs. 0,8±0,1, $p= 0,874$) entre os grupos.

Ao considerar a análise por gênero, as mulheres do GDC apresentaram menores valores de peso, altura e perímetro do quadril; entretanto, sem diferenças em relação ao IMC e à relação cintura-quadril. Os homens do GDC apresentaram menores valores de massa magra total (Tabela 4).

Tabela 4. Medidas antropométricas e de composição corporal segundo gênero, Viçosa-MG, 2013.

Parâmetros avaliados	Feminino			Masculino		
	GDC	GCO	p^*	GDC	GCO	p
Peso (kg)	55,5±9,3	63,3±8,7	0,014	72,17,7	78,6±10,1	0,150
Altura (m)	1,6±0,1	1,7±0,1	0,006	1,7±0,1	1,8±0,1	0,328
IMC (kg/m ²)	21,7±3,0	22,9±3,6	0,450	24,0±3,2	25,4±3,2	0,371
PC (cm)	71,4±7,3	76,2±10,4	0,223	85,3±8,8	88,4±8,3	0,429
PQ (cm)	90,8±7,4	96,6±5,3	0,009	94,9±4,0	98,6±6,2	0,173
RCQ	0,8±0,1	0,8±0,1	0,537	0,9±0,1	0,9±0,1	0,954
GC (%)	29,3±7,5	33,0±7,2	0,139	25,4±7,0	25,4±5,5	0,989
MMA (kg)	0,6±0,4	1,1±1,5	0,191	1,5±1,0	1,5±0,6	0,721

IMC = Índice de massa corporal; PC = perímetro da cintura; PQ = perímetro do quadril; RCQ = relação cintura/quadril; GC = gordura corporal; MMA = massa magra abdominal. *Teste t de Student, $p < 0,05$ significância estatística.

A avaliação da proporção de indivíduos acima dos pontos de corte para IMC, PC, RCQ e GC demonstrou que 20% (n=4) dos celíacos se encontravam com sobrepeso/obesidade; 10,5% (n=2) estavam com obesidade abdominal; 15,8% (n=3), com RCQ aumentada substancialmente e 46,1% (n=6), com o percentual de gordura corporal elevado. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A média de pressão arterial sistólica (PAS) do GDC foi de 113 ± 8 mmHg e a de pressão arterial diastólica (PAD), de 74 ± 7 mmHg. A PAS do GCO foi de 112 ± 12 mmHg e a PAD foi de 73 ± 9 mmHg. Não foi encontrada diferença entre os grupos ($p=0,710$ e $p=0,839$, respectivamente). Apenas 1 paciente celíaco (6,25%) apresentou níveis de PAS alterado (> 120 mmHg) e 3 pacientes celíacos (18,7%) apresentaram níveis de PAD alterados (> 80 mmHg).

5.1.1 Referências bibliográficas

ABADIE, V.; SOLLID, L. M.; BARREIRO, L. B.; JABRI, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. **Annual Review of Immunology** 2011; 29(1):493-525.

ALENCAR, M. L. Estudo da prevalência da doença celíaca em doadores de sangue na cidade de São Paulo. **Tese de Doutorado em Gastroenterologia Clínica**. Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 2007.

ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, 2009; 60:240-257.

ANNIBALE, B.; SEVERI, C.; CHISTOLINI, A.; ANTONELLI, G. Efficacy of gluten-free diet alone on recovery from iron deficiency anemia in adult celiac patients. **The American Journal of Gastroenterology** 2001; 96(1):132-137.

ARAÚJO, H. M. C. A.; BOTELHO, W. .M. C.; ZANDONADI, R. B. A.; PUPPIN, R. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição** 2010; 23:467-474.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA. **Critério de classificação econômica Brasil**. Disponível em: <<http://www.abep.org/novo/Content.aspx?ContentID=301>>. Acesso em 25/06/2011.

BAPTISTA, M. L. Doença celíaca: uma visão contemporânea. *Pediatria* 2006; 28(4):262-271.

BARBOSA, K. B. F. **Consumo Alimentar e marcadores de risco para a síndrome metabólica em adolescentes do sexo feminino: comparação entre instrumentos de inquérito dietético** 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BARDELLA, M. T.; FREDELLA, C.; PRAMPOLINI, L.; MOLTEI, N.; GIUNTA, A. M. Body composition and dietary intakes in adult celiac disease patients consuming a strict gluten-free diet. **The American Journal of Clinical Nutrition** 2000; 72(4):937-939.

BARTON, S. H.; KELLY, D. G.; MURRAY, J. A. Nutritional Deficiencies in Celiac Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, 2007; 36(1)93-108.

BERTINI, I.; CALABRÒ, A.; DE CARLI, V.; LUCHINAT, C. The metabonomic signature of celiac disease. **Journal of Proteome Research** 2008; 8(1)170-177.

BIAGI, F. et al. A gluten-free diet score to evaluate dietary compliance in patients with coeliac disease. **British Journal of Nutrition** 102:882-887, 2009.

BRANSKI, D. New insights in celiac disease. **Rambam Maimonides Medical Journal** 3(1):1-4, 2012.

BRAY, G. et al. Definitions and proposed current classifications of obesity. **Handbook of obesity**. New York: Marcel Dekker, 1998.

BROWN, I.; MINO-KENUDSON, M.; DESHPANDE, V.; LAUWERS, G. Y. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: an increasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 2006; 130(7):1020-1025.

CAJA, S.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K.; LINDFORS, K. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. **Cellular & Molecular Immunology** 8: 103-109, 2011.

CATALDO, M. G. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. **World Journal of Gastroenterology** 2007; 15:2153-2159.

CHAND, N. M. D.; MIHAS, A. M. D. F. Celiac Disease: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. **Journal of Clinical Gastroenterology** 2006; 40(1):3-14.

COLLADO, M. C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Differences between the faecal microbiota of coeliac children and healthy controls. **Current Issues in Intestinal Microbiology** 2007; 8:9–14.

COLLADO, M. C.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. **Journal of Clinical Pathology** 2009; 62:264–269.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; LAITINEN, K. *et al.* Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **American Journal of Clinical Nutrition**. 88:894–899, 2008.

DE LA COCHETIÈRE, M. F.; DURAND, T.; LEPAGE, P.; BOURREILLE, A.; GALMICHE, J. P.; DORÉ, J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. **Journal of Clinical Microbiology** 2005; 43:5588-5592.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. L.; RELMAN, D. A. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. **PLOS Biology** 2008; 6(11):2383-2400.

DI CAGNO, R.; ANGELIS, M.; PASQUALE, I.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; RICCIUTI, P.; GAGLIARDI, F.; LAGHI, L.; CRECCHIO, C.; GUERZONI, M. E.; GOBBETTI, M.; FRANCAVILLA, R. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. **BMC Microbiology**. 11:219, 2011.

DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C. G.; GAGLIARDI, F.; RICCIUTI, P.; NDAGIJIMANA, M.; ANGELIS, M. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. **Applied and Environmental Microbiology**. 75(12):3963–3971, 2009.

DORÉ, J.; CORTIER, G. The human intestinal microbiota. **Gastroentérologie Clinique et Biologique** 2010;34(1):7-15.

DÔRES, S. M. C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, A. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição** 2001; 14(3):207-218.

DUARTE, R.; SILVA, A. M.; VIEIRA, L. Q.; AFONSO, L.C.; NICOLI, J. R. Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Journal of Medical Microbiology** 2004;53:741-748.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science** 2005; 308:1635-1638.

ERRICHELLO, S.; ESPOSITO, O.; DI MASE, R.; CAMARCA, M. E.; NATALE, C.; LIMONGELLI, M. G.; MARANO, C. Celiac disease: predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** 2010; 50(1):54-60.

FERRETI, G. et al. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. **Nutrients** 4:243-257, 2012.

FISBERG, R. M. et al. Métodos de inquéritos alimentares. In: ____ **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2005. p. 2-31.

FRANKS, A. H.; HARMSSEN, H. J.; RAANGS, G. C.; JANSEN, G. J.; SCHUT, F.; WELLING, G. W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology** 1998; 64:3336-3345.

FRASER, J. S.; ENGEL, W.; ELLIS, H. J.; MOODIE, S. J.; POLLOCK, E. L.; WIESER, H.; CICLITIRA, P. J. Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. **Gut** 2003; 52(12):1698-1702.

FRIC, P.; GABROVSKA, D.; NEVORAL, J.. Celiac disease, gluten-free diet, and oats. **Nutrition Reviews** 2011; 69(2):107-115.

GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; CORDOBA, J. C.; TAUIL, P. L. GASPARIN, M.; CATASSI, C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **The American Journal of Gastroenterology** 2000; 95(3):689-692.

GARSED, K.; SCOTT, B. B. Can oats be taken in a gluten-free diet? A systematic review. **Scandinavian Journal of Gastroenterology** 2007; 42(2):171-178.

GREEN, P. H.; CELLIER, C. Celiac Disease. **New England Journal of Medicine** 2007; 357(17):1731-1743.

GREEN, P. H. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. **Gastroenterology** 128:S74-S78, 2005.

GRZEŚKOWIAK Ł.; COLLADO, M. C.; MANGANI, Z.; MALETA, Z.; LAITINEN, K.; ASHORN, P.; ISOLAURI, J.; SALMINEN, S. Distinct Gut Microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 54: 812–816, 2012.

HAINES, M. L.; ANDERSON, R. P.; GIBSON, P. R. Systematic review: the evidence base for long-term management of coeliac disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics** 2008; 28(9):1042-1066.

HALLERT, C.; SVENSSON, M.; THOLSTRUP, J.; HULTBERG, B. Clinical trial: B vitamins improve health in patients with coeliac disease living on a gluten-free diet. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics** 2009; 29(8):811-816.

HOPPER, A. D. *et al.* What is the role of serologic testing in celiac disease? a prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** 6:314-320, 2008.

HOROWITZ, S. Celiac disease: new directions in diagnosis, treatment, and prevention. **Alternative and Complementary Therapies**, v.17, n.2, 2011.

HOURIGAN, C. The molecular basis of coeliac disease. **Clinical and Experimental Medicine** 2006; 6(2):53-59.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. **Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs): Acceptable macronutrient Distribution ranges. In: **Dietary References Intakes**. Washington, DC: The National Academy Press, 2002.

KAGNOFF, M. F. Overview and pathogenesis of celiac disease. **Gastroenterology** 2005; 128:4(1)10-18.

KAGNOFF, M. F. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. **The Journal of Clinical Investigation** 2007; 117(1):41-49.

KEMPPAINEN, T. A.; HEIKKINEN, M. T.; RISTIKANKARE, M. K.; KOSMA, V. M.; JULKUNEN, R. J. Nutrient intakes during diets including unkilned and large amounts of oats in celiac disease. **European Journal of Clinical Nutrition** 2010; 64(1):62-67.

KINSEY, L.; BURDEN, S. T.; BANNERMAN, E. A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population. **European Journal of Clinical Nutrition** 2007; 62(11):1333-1342.

KUPPER, C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. **Gastroenterology** 2005; 128(4):121-127.

LAY, C.; SUTREN, M.; ROCHET, V.; SAUNIER, K.; DORÉ, J.; RIGOTTIER-GOIS, L. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the Clostridium leptum subgroup in human faecal microbiota. **Environmental Microbiology** 2005;7:933-946.

LEE, A. R. et al. The effect of substituting alternative grains in the diet on the nutritional profile of the gluten-free diet. **Journal of Human Nutrition and Dietetics** 2009; 22(4):359-363.

LEWIS, N. R.; SCOTT, B. B. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics** 31:73-81, 2010.

LIONETTI, E.; CATASSI, C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. **International Reviews of Immunology**. 30:219–231, 2011.

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). **Gastroenterology** 102:330-354, 1992.

MATSUDO, S. M. M.; ARAÚJO, T.; MARSUDO, V. *et al.* Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde** 2001; 6(2):5-18.

MONTEIRO, J. P. *et al.* **Consumo alimentar** : visualizando porções. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** 1993; 59(3):695-700.

NADAL, I.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. **Journal of Medical Microbiology** 2007; 56:1669–1674.

NIEWINSKI, M. M. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. **Journal of the American Dietetic Association** 2008; 108(4):661-672.

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; HERRÁN, A. R. *et al.* Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. **Inflammatory Bowel Diseases** 2012; 8(4):649-656. a

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; VIVAS, S.; MORALES, J. M. R.; MIERA, L. E. S.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; CASQUEIRO, J. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. **Biochimie** 2012; 94(8):1724-1729. b

OBERHUBER, G. et al The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology** 11:1185–1194, 1999.

O'CONNOR, E.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K. F.; JAKOBSEN, J.; CASHMAN, K. D. Serum percentage undercarboxylated osteocalcin, a sensitive measure of vitamin K status, and its relationship to bone health indices in Danish girls. **The British Journal of Nutrition** 2007; 97(4):661–666.

OJETTI, V.; NUCERA, G.; MIGNECO, A.; GABRIELLI, M.; LAURITANO, C.; DANESE, S. High Prevalence of Celiac Disease in Patients with Lactose Intolerance. **Digestion** 2005; 71(2):106-110.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C. Germ-free mice produce high levels of interferongamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology** 2005; 131:477-488.

PATE, R. R. et al. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **JAMA** 273:402-407, 1995.

PEREIRA, M. A.; NISHITOKUKADO, I.; SATO, M. N.; DAMIÃO, A. O. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology** 2006; 12(40):6546-6550.

PETEIRO-GONZÁLEZ, D.; OLMOS, M. A. M. et al. Enfermedad celíaca del adulto: aspectos endocrinológicos y nutricionales. **Nutrición Hospitalaria** 2010; 25:860-863.

- PETER, H. R.; GREEN, B. J. Coeliac disease. **The Lancet** 2003; 362:383-391.
- PICON, P. D.; BELTRAME, A. **Doença celíaca. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas** 2009.
- PINHEIRO, A. B. V.; BENZECRY, E. H.; LACERDA, E. M. A. **Tabela para avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- PRATESI, R.; GANDOLFI, L. Doença celíaca: a afecção com múltiplas faces. **Jornal de Pediatria** 2005; 81(5):357-358.
- RAYMOND, N. et al. The gluten-free diet: an update for health professionals. **Practical Gastroenterology**, gluten-free series 1, p. 73-91, 2006.
- ROBINS, G.; AKOBENG, A.; KIRK, E. et al. A systematic literature review on the nutritional adequacy of a typical gluten-free diet with particular reference to iron, calcium, folate and B vitamins. **Food Standards Agency website** 2009.
- RODRIGO, L. Celiac disease. **World Journal of Gastroenterology** 2006; 12(41):6585-6593.
- RODRIGO-SÁEZ, L. P. Adult celiac disease - a common, significant health problem worldwide. **Revista Española de Enfermedades Digestivas** 2010; 102(8):461-465.
- ROSS, A. C.; MANSON, J. E.; ABRAMS, S. A. The 2011 Report on dietary reference intakes for calcium and vitamin d from the institute of medicine: what clinicians need to know. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 2011; 96(1):53-58.
- ROSSI, M.; SCHWARTZ, K. B. Editorial: Celiac disease and intestinal bacteria: not only gluten? **Journal of Leukocyte Biology** 2010; 87(5):749-751.
- ROSTOM, A.; DUBÉ, C.; CRANNEY, A.; SALOOJEE, N.; SY, R.; GARRITTY, C.; SAMPSON, M.; ZHANG, L. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. **Gastroenterology** 128:S38–S46, 2005.

RUDE, R. K.; OLERICH, M. Magnesium deficiency: Possible role in osteoporosis associated with gluten-sensitive enteropathy. **Osteoporosis International** 1996; 6(6):453-461.

SALES, R. L. et al. **Avaliando o consumo alimentar por fotos**. 1.ed. Viçosa, 2009.

SANTOS, S. M. **Dicas iniciais de alimentação saudável na doença celíaca**. Folder. Disponível em: <http://www.riosemgluten.com/folder_dicas_DC_web.pdf> Acesso em: 05/11/2011.

SANZ, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. **Gut Microbes** 2010; 1(3):135-137.

SANZ, Y.; SÁNCHEZ, E.; MARZOTTO, M.; CALABUIG, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 2007;51(3):562–568.

SATURNI, L.; FERRETTI, G.; BACCHETTI, T. The Gluten-Free Diet: Safety and Nutritional Quality. **Nutrients** 2010; 2(1):16-34.

SBC - Sociedade brasileira de Cardiologia. VI Diretriz de hipertensão. **Brazilian Journal of hypertension** 17(1):1-69, 2010.

SCHUPPAN, D. et al. Celiac Disease: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Nutritional Management. **Nutrition in Clinical Care** 2005; 8(2):54-69.

SELIMOGLU, M. A.; KARABIBER, H. Celiac Disease: Prevention and Treatment. **Journal of Clinical Gastroenterology** 2010; 44(1):4-8.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUI, A. *et al.* Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. **Applied and Environmental Microbiology** 66:2263-2266, 2000.

SILVA, T. S. D. G. E.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira** 2010; 56:122-126.

SMIRICKY-TJARDES, M. R.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; FAHEY, G. C. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science** 2003; 81(10):2535-2545.

TACK, G. J.; VERBEEK, W. H.; SCHREURS, M. W.; MULDER, C. J. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** 2010; 7(4):204-213.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. NEPA/UNICAMP. 1. ed. Campinas, SP, 2006.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas, SP, 2011.

TEIXEIRA, T. F. S.; GRZEŚKOWIAK, Ł.; FRANCESCHINI, S. C. C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L. L. F.; PELUZIO, M. C. G. Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. **British Journal of Nutrition**. 109, 914–919, 2013.

THOMPSON, T. Oats and the gluten-free diet. **Journal of the American Dietetic Association** 2003; 103:376-379.

THOMPSON, T.; DENNIS, M.; HIGGINS, L. A.; LEE, A. R. Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fiber, iron, calcium and grain foods? **Journal of Human Nutrition and Dietetics** 2005; 18(3):163-169.

THOMPSON, T. Folate, Iron, and Dietary Fiber Contents of the Gluten-free

Diet. **Journal of the American Dietetic Association** 2000; 100(11):1389-1396.

TJELLSTRÖM, B.; STENHAMMAR, L.; HOGBERG, L.; FÄLTH-MAGNUSSON, K. Gut microflora associated characteristics in children with coeliac disease. **The American Journal of Gastroenterology** 2005; 100:2784–2788.

TJON, J. M. L. et al. Celiac disease: how complicated can it get? **Immunogenetics** 62: 641-651, 2010.

TORRES MI, L. C. M.; RIOS. A. New aspects in celiac disease. **World Journal of Gastroenterology** 2007; 13(8):1156-1161.

TRONCONE, R.; AURICCHIO, R.; GRANATA, V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** 2008; 11(3):329-333.

TRONCONE, R.; JABRI, B. Coeliac disease and gluten sensitivity. **Journal of Internal Medicine** 269(6): 582-590, 2011.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; BRANDT, E.; SWINGS, J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. **FEMS Microbiology Ecology** 2004;48:437-446.

VILLANACCI, C. C.; ROSTAMI, K.; VOLTA, U. Celiac disease: changing dogma on historical diagnosis. **Gastroenterology** 2010.

VILPPULA, A.; KAUKINEN, K.; LUOSTARINEN, L.; KREKELÄ I.; PATRIKAINEN, H. Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. **BMC Gastroenterology** 11(1):136, 2011.

VIVAS, S.; RUIZ DE MORALES, J. M.; FERNANDEZ, M.; HERRERO, B.; CASQUEIRO, J.; GUTIERREZ, S. Age-related clinical, serological and histopathological features of celiac disease. **The American Journal of Gastroenterology** 2008; 103:2360-2365.

VISSER, J., ROZING, J.; SAPONE, A. Tight junctions, intestinal permeability and autoimmunity celiac disease and type 1 diabetes paradigms. **Annal of the New York Academy os Sciences**, 1165:195-205, 2009.

VOLTA, U.; VILLANACCI, V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. **Cellular and Molecular Immunology** 2011; 8(2):96-102.

WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A. Aspectos históricos e metodológicos da medição e estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão da literatura. **Cadernos de Saúde Pública** 17:801-817, 2001.

WALKER-SMITH, J. A. et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. **Archives of Diseases in Childhood** 65(8):909-911, 1990.

WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; SIMMONS, R. L. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. **Reviews of Infectious Diseases** 1988;10:958-79.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology** 2007; 24(2):115-119.

WGO. **World Gastroenterology Organisation**. Celiac disease. Global guidelines, 2012. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/celiac-disease.html>>. Acessado em 07/10/2012.

WHO - World Health Organization. **Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO expert consultation**. Geneva: WHO, 2008.

WHO - World Health Organization. **Who scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level**. Summary Meeting Report Brussels, Belgium 2004.

WHO - World Health Organization. **Phisycal status: the use and interpretation of anthropometry**. Report of a WHO expert committee. WHO technical report series 894. Geneva: WHO, 1995. Disponível em: <<http://helid.digicollection.org/en/d/Jh0211e/>>. Acesso em 30/05/2011.

WHO - World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: WHO, 2000. Disponível em: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html> Acesso em: 30/05/2011.

ZANINI, B.; MAGNI, A.; CASELANI, F.; LANZAROTTO, F.; CARABELLESE, N.; VILLANACCI, V.; RICCI, C.; LANZINI, A. High tissue-transglutaminase antibody level predicts small intestine villous atrophy in adult patients at high risk of celiac disease. **Digestive and Liver Disease** 44:280-285, 2012.

5.2. Artigo 1

INTESTINAL MICROBIOTA AND PROBIOTICS IN CELIAC DISEASE: WHERE ARE WE?

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is a common chronic autoimmune enteropathy, triggered by gluten intake. To date, the only therapy for CD is the complete exclusion of dietary sources of grains and any food containing gluten. It has been hypothesized that microbiota is somehow involved in CD. For this reason, probiotics are appearing as an interesting adjuvant in the dietetic management of CD. This review aims to discuss the characteristics of microbiota in CD subjects and the use of probiotics as a novel therapy for CD. The comparison between CD children and controls shows that their microbiota profile differs. Some probiotics have been found to digest or alter gluten chemistry. It has also been demonstrated that some bacterial species are able to protect epithelial cells from cellular damage induced by gliadin incubation.

INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is a common chronic lifelong autoimmune enteropathy, triggered by the consumption of specific proteins by genetically susceptible individuals (POZO-RUBIO *et al.*, 2012; SCHUPPAN, JUNKER & BARISANI, 2009). Such proteins are present specifically in cereals, and according to the food source receive specific names, such as gliadin in wheat, hordein in barley and secalin in rye. As these proteins share structural similarities, they are collectively known as gluten (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; ROMA *et al.*, 2010). Gluten proteins can be divided into two main fractions, which are the soluble gliadins and the insoluble glutenins, both with high glutamine and proline contents (WIESER, 2007).

Proteases from the intestine of CD patients may inefficiently break gluten peptides, therefore enhancing the availability of the entire peptides. These may translocate through the intestinal epithelial mucosa via either epithelial transcytosis or increased epithelial tight junction (TJ) permeability (SCHUPPAN, JUNKER & BARISANI, 2009). In the lamina propria, gluten peptides are presented to CD4⁺ T immune cells (KUPFE & JABRI, 2012) activating secretion of Th1 cytokines, such as gamma interferon (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF- α), and matrix metalloproteinases. Together, this

response promotes matrix degradation, mucosal remodeling, villous atrophy, crypt cell hyperplasia and increased number of intraepithelial cells (LIONETTI & CATASSI, 2011).

It is still not clear whether altered intestinal permeability is a primary cause or a consequence of intestinal inflammation in CD. There is growing evidence that enhanced intestinal permeability plays a crucial role in the development of various autoimmune disorders, including CD (KALLIOMÄKI *et al.*, 2012; NISTAL *et al.*, 2012; COLLADO *et al.*, 2007; VAN ELBURG *et al.*, 1993). It has been found that TJ assembly regulates peptide transport (WAPENAAR *et al.*, 2008). Zonulin is a protein that exhibits the ability to reversibly modulate intercellular tight junctions (FASANO, 2011). Gliadin activates zonulin signaling in CD patients, leading to increased intestinal permeability to macromolecules (DRAGO *et al.*, 2006). Furthermore, some studies indicate that shifts in gut microbiota may also lead to a raised intestinal permeability (FRAZIER *et al.*, 2011; CANI *et al.*, 2009).

In this context, it has been hypothesized that microbiota is somehow involved in CD. In addition, probiotics appear as an interesting adjuvant in the dietetic management of CD. This review aims to discuss the characteristics of celiac patients microbiota and the use of probiotics as a novel therapy for CD.

MICROBIOTA AND CD

The human gastrointestinal tract is a complex and dynamic environment, sheltering a vast number and variety of commensal microorganisms (KAU *et al.*, 2011). This balanced microecosystem provides a natural defense for the host against invasion of potential pathogens. Recently, research has focused on the important role of human gut microbiota in relation to health and disease (TURNBAUGH *et al.*, 2007). Studies on the gut microbiota in CD pathophysiology are still in their early stages. The main findings related to microbiota composition in CD subjects are summarized in table 1.

Table 1. Main findings related to microbiota composition in CD subjects. The content includes studies developed with distinct populations, samples and methodology approach.

SUBJECTS	SPECIMEN	METHOD	MAIN FINDINGS CD vs CONTROLS	REFERENCE
26 untreated CD children and 23 controls	Feces	Culture	↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> and <i>Staphylococcus</i> .	COLLADO <i>et al.</i> , 2007 (Spain)
		FISH-FC	↑ <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Clostridium histolyticum</i> ; ↑ <i>Eubacterium rectale</i> – <i>Clostridium coccooides</i> , <i>Atopobium</i> and sulphate-reducing bacteria; ↓ <i>Bifidobacterium</i> (non significant).	
10 untreated CD children and 10 controls	Feces	DGGE	↑ bacterial diversity; ↔ <i>Lactobacillus</i> diversity; ↓ <i>Bifidobacterium</i> diversity; ↑ prevalence of <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and <i>Leuconostoc carnosum</i> ; ↓ prevalence of <i>Lactobacillus casei</i> group (including <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> or <i>L. zeae</i>); <i>Bifidobacterium adolescentis</i> not detected in CD.	SANZ <i>et al.</i> , 2007 (Spain)
20 untreated CD children, 10 treated CD children and 8 controls	Duodenal biopsies	FISH-FC	↑ total and Gram-negative (untreated vs. treated and control); ↑ <i>Bacteroides-Prevotella</i> group and <i>Escherichia coli</i> (untreated vs. control); ↓ <i>Lactobacillus-Bifidobacterium/Bacteroides-Prevotella</i> ratio; ↓ Gram-positive; ↔ <i>Atopobium</i> , <i>Eubacterium rectale</i> – <i>Clostridium coccooides</i> , <i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Clostridium lituseburense</i> , sulphate-reducing bacteria and <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> groups (untreated vs. controls).	Nadal <i>et al.</i> , 2007 (Spain)
30 untreated CD children, 18 treated CD children and 30 controls	Feces	qPCR	↑ prevalence of <i>Bifidobacterium adolescentis</i> and <i>Bifidobacterium breve</i> in untreated; ↑ prevalence of <i>Bifidobacterium dentium</i> (also found in controls); ↓ <i>Bifidobacterium catenulatum</i> (CD vs. control).	Collado <i>et al.</i> , 2008 (Spain)
25 untreated CD children, 8 treated CD children and 8 controls	Duodenal biopsies	qPCR	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium catenulatum</i> detected in all samples; <i>Bifidobacterium dentium</i> detected only in CD; ↑ <i>Bifidobacterium breve</i> (untreated vs. treated and controls); ↓ <i>Bifidobacterium lactis</i> (untreated vs. treated and controls); ↓ <i>Bifidobacterium catenulatum</i> (CD vs. controls).	
25 untreated CD children, 8 treated CD children and 8 controls	Feces	qPCR	↑ total bacteria; ↑ <i>Bifidobacterium dentium</i> (treated vs. control); ↑ <i>Bifidobacterium breve</i> (untreated vs. treated and controls); ↔ <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium leptum</i> and <i>Escherichia coli</i> (untreated vs. treated); ↑ <i>Staphylococcus</i> (untreated vs. treated).	Collado <i>et al.</i> , 2009 (Spain)
	Biopsies	qPCR	↓ <i>Clostridium coccooides</i> ; ↑ <i>Lactobacillus</i> group and <i>Akkermansia muciniphila</i> (untreated vs. treated and controls); ↑ <i>Staphylococcus</i> ; ↔ <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium leptum</i> and <i>Escherichia coli</i> .	

7 untreated CD children, 7 treated CD children and 7 controls	Feces	Culture	<p>↓ lactic acid bacteria, <i>Bifidobacterium</i> and <i>Staphylococcus/Micrococcus</i> (CD vs. controls);</p> <p>↑ <i>Bacteroides</i> and <i>Clostridium</i> (CD vs. controls);</p> <p><i>L. plantarum</i>, <i>L. paracasei</i>, <i>L. rhamnosus</i> and <i>B. longum</i> in all groups;</p> <p><i>L. brevis</i>, <i>L. rossiae</i>, <i>Lactobacillus pentosus</i>, <i>Bifidobacterium bifidum</i> not found in untreated;</p> <p><i>L. fermentum</i>, <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> and <i>L. gasseri</i> only in controls.</p>	Di Cagno <i>et al.</i> , 2009 (Italy)
24 untreated CD children, 18 treated CD children and 20 controls	Feces	IgA-coated	<p>↓ IgA-coated bacteria (CD vs. controls);</p> <p>↓ total Gram-positive bacterial populations;</p> <p>↓ <i>Bifidobacterium</i> proportions, <i>C. histolyticum</i>, <i>C. lituseburensis</i> and <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> groups (untreated vs. controls);</p> <p>↑ <i>Bacteroides</i> – <i>Prevotella</i> group (untreated vs. controls);</p> <p>↔ <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Lactobacillus</i> – <i>Enterococcus</i> and sulphate-reducing bacteria (untreated, treated and controls).</p>	Palma <i>et al.</i> , 2010 (Spain)
19 treated CD children and 15 controls	Feces and biopsies	DGGE	DGGE profiles of fecal samples were richer than in biopsies; Bifidobacteria not found in CD biopsies.	Di Cagno <i>et al.</i> , 2011 (Italy)
	Feces and biopsies	Culture	<p>↓ <i>Lactobacillus</i>, <i>Enterococcus</i> and <i>Bifidobacteria</i> (CD vs. controls) feces);</p> <p>↑ <i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i>, <i>Porphyromonas</i> and <i>Staphylococcus</i> (feces CD vs. controls);</p> <p>↔ <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Klebsiella</i> and <i>Clostridium</i> (feces).</p>	
8 untreated CD children and 5 controls; 5 untreated CD adults, 5 treated CD adults and 5 controls	Duodenal biopsies	16S rRNA gene sequencing	<p>Adults vs. children CD: <i>Firmicutes</i> (38% vs. 34%), <i>Proteobacteria</i> (29% vs. 38%), <i>Bacteroidetes</i> (17% vs. 13%), <i>Actinobacteria</i> (10% vs. 4%), <i>Fusobacteria</i> (4% vs. 2.9%), <i>Deinococcus-Thermus</i> (0 vs. 2.7%);</p> <p>Adult (61 different genera) and children (36 different genera);</p> <p>↑ <i>Prevotella</i> spp. and <i>Streptococcus</i> spp. (treated vs. untreated), <i>Mycobacterium</i> spp. and <i>Methylobacterium</i> spp (CD vs. control);</p> <p>↓ <i>Streptococcus</i> and <i>Prevotella</i> (untreated CD CH vs. control);</p> <p>↑ <i>Neisseria</i> spp. and <i>Haemophilus</i> spp (untreated vs. control).</p>	Nistal <i>et al.</i> , 2012a (Spain)
10 untreated CD adults, 11 treated CD adults, 11 controls and 10 controls on GFD	Feces	DGGE	<p>↑ diversity of <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> groups (untreated and control vs. treated);</p> <p>↑ <i>Lactobacillus sakei</i> (untreated and controls vs. treated);</p> <p>↑ <i>Bifidobacterium bifidum</i> and <i>Bifidobacterium catenulatum</i> (untreated vs. control).</p>	Nistal <i>et al.</i> , 2012b (Spain)

CD is a common disorder in children and adults (VIVAS *et al.*, 2008). Nevertheless, our knowledge about the intestinal microbiota of adults with CD is still sparse. Indeed, it can be noted that only in 2012, the studies characterizing microbiota of CD adult patients began (NISTAL *et al.* 2012). Studies before 2012 were conducted notably in children (COLLADO *et al.*, 2007; SANZ *et al.*, 2007; NADAL *et al.*, 2007; PALMA *et al.*, 2010; DI CAGNO *et al.*, 2011). A single study accomplishing both children and adults reported a slight difference in the percentage of the main phyla between the subjects and also a more diverse profile in duodenal biopsies from adults (NISTAL *et al.*, 2012a). *Firmicutes* are the most abundant in CD adults, while *Proteobacteria* are present mainly in CD children. Other phyla shared between CD adults and CD children belong to *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Regarding genera, CD adults contain higher number of *Mycobacterium* spp. and *Methylobacterium* spp., while CD children are more abundant in *Neisseria* spp. and *Haemophilus* spp. bacteria. The future studies should focus on the similarities between children and adult with CD compared with healthy controls. If a causality relation is aimed to be established, it would then be expected that a common finding regarding to a specific bacterial group should be shared between children and adults.

It is still not clear whether altered microbiota in CD patients could be the cause or the consequence of the disease. It is hypothesized that Gram-negative bacteria in genetically susceptible individuals may contribute to induce loss of tolerance to gluten. If modified microbiota is a result of the disease, the damaged mucosa covered by immature enterocytes could create conditions favoring Gram-negative instead of Gram-positive bacterial colonization. Duodenal biopsies from untreated CD children showed higher total and Gram-negative populations compared to treated CD and healthy controls groups. Furthermore, the levels of Gram-positive bacteria were lower in CD children (untreated and treated) compared to controls (NADAL *et al.*, 2007). Thus, the proportion between gram-negative and gram-positive bacteria seems to be of importance.

The possibility that unfavorable bacteria may colonize the intestinal mucosa indicates the need to evaluate the microbiota from this site. Sampling by biopsy is an invasive method in healthy individuals, while feces remain still the easiest and non-invasive source of data collection. Even though, the proportions of studies in CD using biopsies

and feces for microbiota characterization were almost the same so far. In general, clear differences between mucosa associated microorganisms and fecal microbiota are expected (WANG *et al.*, 2005; OUWEHAND *et al.* 2004). Indeed, Ouwehand and collaborators (2004) found four times greater numbers of bifidobacteria in the feces of healthy infants when compared to the mucosa of the group with rectal bleeding. Corroborating this finding, Di Cagno and co-workers (2011) did not find bifidobacteria in biopsies of CD subjects but detected them in feces. In addition, the authors showed that microbiota diversity was higher in fecal samples than biopsies (DI CAGNO *et al.*, 2011). In contrast, the group of Collado (2009) showed high correlations values between the fecal and biopsy levels of *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *C. coccoides*, *C. leptum*, *Lactobacillus* and *E. coli* in both untreated and treated CD patients and controls. *Akkermansia muciniphila* correlation was only detected in controls. Nevertheless, the presented data suggest that the unidentified part of the microbiota, especially on the mucosa, deserves more attention.

The comparison between CD children and controls shows that their microbiota profile differs. Higher counts of *Bacteroides* are detected in CD children (NADAL *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2007) in comparison to controls. Particularly, *Bacteroides* are an important fraction of the human gut microbiota and some species, such as *B. vulgatus* and *B. fragilis* have been found to exhibit pro-inflammatory effects (SETOYAMA *et al.*, 2003), indicating the importance of investigate this group at species level. The data on the levels of *Atopobium*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Eub. rectale* – *C. coccoides*, *C. histolyticum*, *C. lituseburensis* and sulphate-reducing bacteria are still contradictory. There are reports showing increased levels in CD (COLLADO *et al.*, 2007) or no difference (NADAL *et al.*, 2007, COLLADO *et al.*, 2009, PALMA *et al.*, 2010) in comparison to controls. Reports regarding the characterization of the main groups containing probiotics species, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, are of great interest. Since these bacteria are associated with protective beneficial mechanisms to the host and anti-inflammatory effects, it is expected that CD subjects would present lower lactobacilli and bifidobacteria levels. Indeed, their levels tend to be lower in CD children in comparison to healthy controls (COLLADO *et al.*, 2007). The ratio of beneficial lactobacilli and bifidobacteria to possibly harmful Gram-negative bacteria, *Bacteroides-Prevotella* and *E. coli*, was found to be significantly higher in controls than

in CD children (NADAL *et al.*, 2007). Regarding bifidobacterial diversity in CD patients, contradictory results are reported: lower diversity in CD children (Sanz and collaborators, 2007) and higher diversity of lactobacilli and bifidobacteria in CD adults (Nistal, 2012b) in comparison to controls. It has been shown that specific species of lactobacilli and bifidobacteria may be higher, lower or not detected in CD patients in comparison to controls (Table 1). However, the exact value of this information still remains unclear.

In summary, different methods have been used to characterize the mucosal and luminal microbiota of CD patients, providing quantitative (FISH-FC and real-time PCR) and qualitative results (DGGE). This may contribute to the lack of consensus about the exact bacterial content in CD, together with the patients' age range, specimen (biopsy or feces) and the small number of studies.

PROBIOTICS AND CD

To date, the only therapy for CD is the mandatory and complete exclusion of dietary sources of grains and any food containing gluten (TACK *et al.*, 2010; FASANO & CATASSI, 2001). However, many patients face difficulties in following the gluten free diet. The compliance to therapy vary largely, being from around 80 % in patients diagnosed before 4 years old and to a less than 40 % in those diagnosed after 4 years of age (HÖGBERG *et al.*, 2013).

New insights into CD pathophysiology have led to novel therapeutic approaches and many other treatments have been identified, such as genetically modified gluten, zonulin inhibitor, therapeutic vaccine, tissue transglutaminase inhibitors and recently also probiotics (BAKSHI *et al.*, 2012).

According to FAO/WHO, probiotic is defined as "live microorganism, which when administered in adequate amounts confers a health benefit on the host" (FAO/WHO, 2002). Abnormalities in the intestinal microbiome in patients with CD have prompted consideration of the use of probiotics as a promising alternative.

The documented mechanisms by which probiotics may protect the host from intestinal disorders and infection include (1) production of inhibitory substances against pathogens (organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins), (2) blockage of

adhesion sites, (3) competition for nutrients, (4) degradation of toxin receptor, and (5) regulation of immunity (VANDERPOOL, YAN & POLK, 2008). The molecular mechanisms of probiotic action still need to be characterized. More studies are required to assess the action of particular probiotics against specific pathogens and disorders and to define which of these actions may benefit CD patients.

Some probiotics have been found to digest or alter gluten chemistry. Angelis and co-workers (2006) analyzed the potential role of the probiotic preparation VSL#3 (a mixture of strains belonging to *St. thermophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii bulgaricus*, *B. breve*, *B. longum* and *B. infantis* species) in decreasing the toxicity of wheat flour during long-time fermentation. The study found that the probiotic VSL#3 was highly more effective in hydrolyzing gliadin polypeptides when compared to other commercial probiotic products such as Oxadrop (*Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *B. infantis* and *St. thermophilus*), Florisia (*Lb. brevis*, *Lb. salivarius salicinius* and *Lb. plantarum*) and Yovis (*St. salivarius thermophilus*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii bulgaricus*, *St. faecium*). Furthermore, enzyme activities specific for proline-rich peptides and general aminopeptidases, which determine the hydrolysis of gliadin epitopes, were largely distributed in the probiotic VSL#3 preparation. The other commercially available probiotic products seem to lack the same capacity to degrade gliadin polypeptides. Interestingly, Angelis and co-workers (2006) also observed that the capacity of VSL#3 to hydrolyze gliadin was lost when the strains were tested individually. The outcomes suggest that single probiotic is not sufficient to degrade gliadin peptides and, therefore, must be used together with other strains to exert the beneficial effect on CD. The probiotic preparation VSL#3 may thus provide better effectiveness in the treatment of CD, since compliance to a gluten-free diet is an extremely challenging task due to cross-contamination, for instance.

Specific strains of the lactobacilli and bifidobacteria have been demonstrated to improve gut health. Palma and collaborators (2010) evaluated *in vitro* the possible immunomodulatory effects of *B. bifidum* IATA-ES2 and *B. longum* ATCC15707 in comparison with *B. fragilis* DSM2451, *E. coli* CBL2 and *Shigella* CBD8 strains on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), under effects of gliadin and IFN- γ . Strains *B. bifidum* IATA-ES2, *B. longum* ATCC15707 were able to induce lower secretion of IL-

12 and IFN- γ when compared to *E. coli* CBL2 and *Shigella* strain CBD8. The secretion of TNF- α was induced by all strains tested but was lower with *B. bifidum* IATA-ES2 compared to *B. fragilis* DSM2451 and *Shigella* CBD8. The highest IL-10 production was observed in response to *B. longum* ATCC15707. It seems that Gram-negative bacteria, such as *E. coli* CBL2 and *Shigella* CBD8, usually trigger higher production of proinflammatory cytokines, which in turn contributes to the development of the disease. On the other hand, *B. bifidum* IATA-ES2 was able to improve intestinal epithelial permeability, since it stimulated the lowest production of TNF- α and IFN- γ .

Lindfors and co-workers (2008) found that *B. lactis* was able to protect epithelial cells from cellular damage induced by gliadin incubation. Furthermore, it was observed that the addition of 10^6 and 10^7 CFU/mL of *B. lactis*, but not 10^5 CFU/mL, was able to preserve the TJ in comparison to the cells cultured in the presence of gliadin alone. Supplementation of *Lb. fermentum* at any of the tested concentrations was not able to stimulate the recovery of transepithelial resistance.

Recently, a study in a gliadin-induced enteropathy animal model was developed to observe whether *B. longum* CECT7347 could provide beneficial effects. *B. longum* CECT7347 administration enhanced villi width and enterocytes height, partially restoring the alterations detected in animals sensitized with IFN- γ and gliadin-fed. In addition, it also reduced TNF- α and increased IL-10 production, indicating its ability to favor an anti-inflammatory response in the intestinal mucosa. *B. longum* CECT7347 administration to gliadin-fed animals sensitized with IFN- γ , partially reduced some of the alterations in jejunal structure. This effect could theoretically contribute to the improvement in the gut barrier function and prevent gliadin translocation to the lamina propria (LAPARRA *et al.*, 2012). Similarly, administration of *Lb. casei* ATCC 9595 was able to significantly reduce the levels of TNF- α and to restore the intestinal damage caused by gliadin in HLA-DQ8 transgenic mice treated with indomethacin (D'ARIENZO *et al.*, 2011).

Studies regarding probiotics and CD in humans are very scarce. In a randomized, double-blind, placebo-controlled study, Smecuol and co-workers (2013) aimed to determine the potential effect of *B. infantis* Natren Life Start (NLS) super strain on intestinal permeability, occurrence of symptoms and inflammatory cytokines in

untreated CD adult patients. Results showed that the gut barrier function was not modified by the probiotic administration, probably due to a short time of treatment or inadequate dose. After three weeks from the beginning of treatment with *B. infantis* NLS super strain a marked reduction in indigestion and constipation symptoms was noted. Abdominal pain and diarrheal symptoms scores were also diminished, although without significance. In addition, no differences in inflammatory markers were observed in either of the groups. Although there was a little improvement in digestive symptoms, this noteworthy study demonstrates a potential for the further use of *B. infantis* therapy in CD patients.

CONCLUSIONS

CD is an autoimmune enteropathy triggered by gluten proteins. Consequently, damage in mucosa often happens accompanied by altered intestinal microbiota and increased epithelial permeability. The causality association is not yet defined. It has been demonstrated that levels of bifidobacteria and lactobacilli are reduced in CD patients and, thus, they have been seen as promising targets for probiotic therapy. The strains capable to produce enzymes that degrade gliadin peptides and induce anti-inflammatory effects are believed to be better suited for the treatment of this disorder. Besides, most of the studies on the use of probiotics in maintenance of CD involved children. The majority of studies on probiotics and CD have used strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and the preliminary results are satisfactory. However, more studies are needed to clarify the shifts in bacterial composition in CD and characterize microbiota with potential benefits to the gut health.

REFERENCES

- ANGELIS, M.; RIZZELLO, C. G.; FASANO, A.; CLEMENTE, M. G.; SIMONE, C.; SILANO, M.; VINCENZI, M.; LOSITO, I.; GOBBETTI, M. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1762:80-93, 2006.]
- BAKSHI, A.; STEPHEN, S.; BORUM, M. L.; DOMAN, D. B. Emerging Therapeutic Options for Celiac Disease: Potential Alternatives to a Gluten-Free Diet. **Gastroenterology & Hepatology**. 8(9):582-588, 2012.
- CANI, P. D.; POSSEMIERS, S.; VAN DE WIELE, T.; GUIOT, Y.; EVERARD, A.; ROTTIER, O.; GEURTS, L.; NASLAIN, D.; NEYRINCK, A.; LAMBERT, D. M.; MUCCIOLI, G. G.; DELZENNE, N. M. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**. 2008.

COLLADO, M. C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. 8(1):9-14, 2007.

COLLADO, M. C.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. **Journal of Clinical Pathology**. 62:264-269, 2009.

COLLADO, M. C.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. **BMC Microbiology**. 8:232, 2008.

D'ARIENZO, R.; STEFANILE, R.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; RICCA, E.; TRONCONE, R.; AURICCHIO, S.; ROSSI, M. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. **Scandinavian Journal of Immunology** 74(4):335-341, 2011.

DI CAGNO, R.; ANGELIS, M.; PASQUALE, I.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; RICCIUTI, P.; GAGLIARDI, F.; LAGHI, L.; CRECCHIO, C.; GUERZONI, M. E.; GOBBETTI, M.; FRANCAVILLA, R. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. **BMC Microbiology**. 11:219, 2011.

DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C. G.; GAGLIARDI, F.; RICCIUTI, P.; NDAGIJIMANA, M.; FRANCAVILLA, R.; GUERZONI, M. E.; CRECCHIO, C.; GOBBETTI, M.; ANGELIS, M. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. **Applied and Environmental Microbiology**. 75(12):3963-3971, 2009.

DI PIERRO, M.; CLEMENTE, M. G.; SAPONE, A. T. A.; THAKAR, M.; IACONO, G.; CARROCCIO, A.; D'AGATE, C.; NOT, T.; ZAMPINI, L.; CATASSI, C.; FASANO, A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 41(4):408-419, 2006.

FASANO, A.; CATASSI, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. **Gastroenterology**. 120:636-651, 2001.

FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. **Physiological Reviews**. 2011; 91:151-75.

FERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ, L.; DE-LA-FUENTE, J. Coeliac disease: clinical features in adult populations. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**. 102(8):466-471, 2010.

FRAZIER; T. H.; DIBASE, J. K.; McCLAIN, C. J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 35(1):14-20, 2011.

HEAP, G. A.; VAN HEEL, D. A. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. **Seminars in Immunology**. 21:346-354, 2009.

HÖGBERG, L.; GRODZINSKY, E.; STENHAMMAR, L. Better dietary compliance in patients with coeliac disease diagnosed in early childhood. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 38(7):751-754, 2003.

KALLIOMÄKI, M.; SATOKARI, R.; LÄHTEENOJA, H.; VÄHÄMIKO, S.; GRÖNLUND, J.; ROUTI, T.; SALMINEN, S. Expression of microbiota, toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 54(6):727-732, 2012.

KAU, A. L.; AHERN, P. P.; GRIFFIN, N. W.; GOODMAN, A. L.; GORDON, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474:327–336, 2011.

KUPFE, S. S.; JABRI, B. Pathophysiology of Celiac Disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*. 22(4):639-660, 2012.

LAPARRA, J. M.; OLIVARES, M.; GALLINA, O.; SANZ, Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *Plos One*. 7(2), 2012.

LINDFORS, K.; BLOMQVIST, T.; JUUTI-UUSITALO, K.; STENMAN, S.; VENÄLÄINEN, J.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical and Experimental Immunology*. 152:552-558, 2008.

LIONETTI, E.; CATASSI, C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International Reviews of Immunology*. 30:219–231, 2011.

NADAL, I.; DONANT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology*. 56:1669–1674, 2007.

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; HERRÁN, A. R.; ARIAS, L.; VIVAS, S.; RUIZ DE MORALES, J. M.; CALLEJA, S.; SÁENZ DE MIERA, L. E.; ARROYO, P.; CASQUEIRO, J. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 18(4):649-656, 2012. a

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; VIVAS, S.; RUIZ DE MORALES, J. M.; SÁENZ DE MIERA, L. E.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; CASQUEIRO, J. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie*. 94:1724-1729, 2012. b

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ARVOLA, T.; RUUSKA, T.; ISOLAURI, E. Microbiota composition of the intestinal mucosa: association with fecal microbiota? *Microbiology and Immunology*. 2004;48(7):497-500.

PALMA, G.; CINOVA, J.; STEPANKOVA, R.; TUCKOVA, L.; SANZ, Y. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 87:765-778, 2010.

PALMA, G.; NADAL, I.; COLLADO, M. C.; SANZ, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition*. 102:1154–1160, 2009.

PALMA, G.; NADAL, I.; MEDINA, M.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiology*. 10:63, 2010.

POZO-RUBIO, T.; OLIVARES, M.; NOVA, E.; PALMA, G.; MUJICO, J. R.; FERRER, M. D.; MARCOS,

A.; SANZ, Y. Immune development and intestinal microbiota in celiac disease. **Clinical and Developmental Immunology**. 2012.

ROMA, E.; ROUBANI, A.; KOLIA, E.; PANAYIOTOU, J.; ZELLOS, A.; SYRIOPOULOU, V. P. Dietary compliance and life style of children with celiac disease. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 23:176–182, 2010.

SANZ, Y.; SÁNCHEZ, E.; MARZOTTO, M.; CALABUIG, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 51:562–568, 2007.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac Disease: from pathogenesis to novel therapies. **Gastroenterology**. 137:1912–1933, 2009.

SETOYAMA, H.; IMAOKA, A.; ISHIKAWA, H.; UMESAKI, Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. **Microbes Infect**. 5:115–122, 2003.

SMECUOL, E.; HWANG, H. J.; SUGAI, E.; CORSO, L.; CHERŃAVSKY, A. C.; BELLAVITE, F. P.; GONZÁLEZ, A.; VODÁNOVICH, F.; MORENO, M. L.; VÁZQUEZ, H.; LOZANO, G.; NIVELONI, S.; MAZURE, R.; MEDDINGS, J.; MAURIÑO, E.; BAI, J. C. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of *Bifidobacterium infantis* Natren Life Start strain super strain in active celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 47(2):139-147, 2013.

TACK, G. J.; VERBEEK, W. H. M.; SCHREURS M. W. J.; MULDER, C. J. J. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 7(4):204-213, 2010.

TAVAKKOLI, A.; GREEN, P. H. Probiotic therapy for celiac disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 47(2):101-103, 2013.

THAKAR, M.; IACONO, G.; CARROCCIO, A.; D'AGATE, C.; NOT, T.; ZAMPINI, L.; CATASSI, C.; FASANO, A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 41(4):408-419, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**. 449:804–810, 2007.

VAN DER WAAIJ, L. A.; KROESE, F. G.; VISSER, A.; NELIS, G. F.; WESTERVELD, B. D.; JANSEN, P. L.; HUNTER, J. O. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. 16:669-674, 2004.

VAN ELBURG, R. M.; UIL, J. J.; MULDER, C. J.; HEYMANS, H. S. A. Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with celiac disease. **Gut**. 34: 354–357, 1993.

VANDERPOOL, C; YAN, F.; POLK, D. B. mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Disease**. 14(11):1585-1596, 2008.

VIVAS, S.; RUIZ DE MORALES, J. M.; FERNANDEZ, M.; HERNANDO, M.; HERRERO,

B.; CASQUEIRO, J.; GUTIERREZ, S. Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. **The American Journal of Gastroenterology**. 103:2360-2365, 2008.

WANG, M.; AHRNE, S.; JEPSSON, B.; MOLIN, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**. 54:219–231, 2005.

WAPENAAR, M. C.; MONSUUR, A. J.; VAN BODEGRAVEN, A. A.; WEERSMA, R. K.; BEVOVA, M. R.; LINSKENS, R. K.; HOWDLE, P.; HOLMES, G.; MULDER, C. J.; DIJKSTRA, G.; VAN HEEL, D. A.; WIJMENGA, C. Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for celiac disease and ulcerative colitis. **Gut**. 57:463–467, 2008.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**. 24(2):115-119, 2007.

World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. 2002. Available in <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> Accessed in 27/04/2013.

5.3. Artigo 2

GUT MICROBIOTA AND SCFA IN CELIAC ADULT SUBJECTS IN BRAZIL

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is a common chronic inflammatory disease of the upper intestine, triggered by gluten intake in susceptible individuals. Unbalances in gut microbiota have been associated with the disease, since differences in bacterial groups between CD subjects and controls have been reported. There is a lack of studies relating intestinal microbiota and the production of SCFAs in CD adult patients. This study aimed to characterize the differences in the intestinal microbiota of treated CD patients and its association with the amount of fecal SCFA and fiber intake. Bacterial groups did not differ between treated CD adult subjects and controls. Lower amount of butyric acid ($p < 0.05$) and total SCFAs ($p < 0.05$) was observed in the feces of the celiac group. The pH was lower in healthy controls ($p = 0.046$). A negative correlation between fiber intake and bacterial counts of *Enterobacterium* group ($r = -0.64$, $p = 0,046$) in celiac subjects was found. Bacterial groups did not differ between treated CD adult subjects and controls.

INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is a common immune-mediated chronic inflammatory disorder of the small intestine, in genetically predisposed individuals (NISTAL *et al.*, 2012). The consumption of wheat, barley and rye proteins, generally known as gluten (prolamins – gliadin), is usually the main responsible factor for the symptoms of CD, which includes, for instance, diarrhea, abdominal pain, malabsorption and weight loss (VADER *et al.*, 2003; WAHAB *et al.*, 2002). The autoimmune reaction to gliadin peptides

leads to intestinal villous atrophy, crypt cell hyperplasia and higher number of intraepithelial lymphocytes (LINDFORS *et al.*, 2008).

Unbalanced gut microbiota is another factor that may have an important role in the development of CD over the last decades (NISTAL *et al.*, 2012; DI CAGNO *et al.*, 2011; SANZ *et al.*, 2007; COLLADO *et al.*, 2007). It has been shown that CD children present lower levels of beneficial bacteria, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and higher number of *Bacteroides* – *Prevotella*, *Clostridium* and *Enterobacterium*, potentially pro-inflammatory groups (DI CAGNO *et al.*, 2009; COLLADO *et al.*, 2007).

Dietary fiber is a non-digestible food ingredient that beneficially affects the host. It can be metabolized by the commensal gut microbiota, which in turn produces short chain fatty acids, primarily acetic, propionic and butyric acids that show anti-inflammatory properties and act as energy source for colonocytes. Different pattern in the composition of fecal short chain fatty acids (SCFAs) in CD children when compared to healthy control has also been found (NISTAL *et al.*, 2012; TJELLSTRÖM *et al.*, 2005).

CD often manifests in early childhood (NADAL *et al.*, 2007). Nevertheless, its diagnosis happens at resembling ratio in children and adults (NISTAL *et al.*, 2012). To date, there is lack of studies relating intestinal microbiota and SCFAs in CD adult patients. This study aimed to characterize the differences in the intestinal microbiota of treated CD patients and its association with the amount of fecal SCFA and fiber intake.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects and fecal sampling

Altogether thirty-two adults were included in this study: 16 symptom-free biopsy diagnosed celiac patients (mean age 38.3 years old, range 21–59 years old), and 16

healthy controls without no known food intolerance (mean age 36.4 years old, range 20–56 years old). Treated CD patients were on a gluten free diet (GFD) for at least 6 months, and showed negative results for serum tissue transglutaminase – IgA (tTGA). CD was ruled out in the volunteers from the control group also by serum tTGA antibodies, whose levels were normal. None of the participants included in the study had been treated with antibiotics for at least 3 months prior to the sampling time. The study protocol involving human subjects was approved by the Committee on Ethical Practice with human beings of the Federal University of Viçosa in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Written informed consent was signed and obtained from all subjects.

Fresh fecal samples were provided by both groups of subjects. After collection, stools were homogenized and divided into sterile plastic 2 mL Eppendorf tubes and then stored at -20 °C until analysis.

Flow cytometry - Fluorescent In Situ Hybridization (FC-FISH)

Analysis of fecal microbiota was performed according to Grzeškowiak and collaborators (2012). In brief, homogenized fecal samples were fixed overnight, at 4 °C, in 4 % paraformaldehyde. After fixation, samples were centrifuged at 13000 rpm for 5 minutes. Pellet was resuspended in FISH-PBS after supernatant removal. Finally, 96 % ethanol was added and samples were stored at -20 °C until analysis. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) coupled with flow cytometry was performed as previously described (COLLADO *et al.*, 2008b). Briefly, samples were hybridized at specific temperatures in hybridization buffer with specific probes at a concentration of 50 ng/μL. After overnight hybridization, they were washed with buffer without sodium dodecyl sulfate (SDS), centrifuged, and resuspended in PBS. *Eubacterium* (EUB) 338, 338 II and 338 III probes were covalently linked at their 5'-end with carbocyanine 5

(Cy5) (Genone®), and the group-specific probes with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Invitrogen®). Probes included EUB 338, EUB 338 II and EUB338 III, which were used in equimolar mixture for the total bacteria detection (AMANN *et al.*, 2001); Bif164 for the *Bifidobacterium* group, Bac303 for the *Bacteroides-Prevotella* group, His150 for the *Clostridium histolyticum* group, Lab158 for *Lactobacillus-Enterococcus* group, and Enter1432 for *Enterobacterium* group (COLLADO *et al.*, 2008b). Data acquisition was performed with a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA). This instrument is equipped with two light scatter detectors that measure forward and side scatter, besides fluorescence detectors. The event rate was kept at the lowest setting to avoid cell coincidence. A total of 50,000 events was recorded. Data were analyzed with BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson®). Total amount of bacteria was determined with EUB 338, EUB 338II and EUB338III-Cy5 probes. Bacterial groups were enumerated by combining each FITC-labeled group-specific probe with the EUB 338, EUB 338 II and EUB338 III Cy5-labelled probes and counting double-positive cells (RIGOTTIER-GOIS *et al.*, 2003).

Fecal short chain fatty acids (SCFAs) identification and quantification

SCFAs were analyzed as described by Teixeira and co-workers (2013) with some modifications. In brief, around 400 mg of frozen feces were weighted and homogenized by thorough agitation in a vortex with 900 µL of 25 % of *m*-phosphoric acid solution. After incubation at room temperature for 30 minutes, samples were centrifuged (Refrigerated microcentrifuge, HERMLE Z 216MK; Hermle Labortechnik) at 13,500 rpm for 30 minutes, at 4 °C, in Eppendorf tubes. The supernatant was transferred to another new Eppendorf tube. The procedure was repeated three times. The final volume of supernatant from each sample was filtered and diluted with the

same quantity of milli-Q water. Acetic, propionic and butyric acids were measured by GC (model CG-17A; Shimadzu®) equipped with a flame ionization detector and capillary Nukol column (30m x 0.25 mm; Supelco®). Nitrogen was used as the carrier gas with a flow rate of 1.0 mL/min. The temperatures of the injector and detector were set at 220 and 250 °C, respectively. Initial column temperature was 100 °C sustained for 5 min, rising at 10 °C/min, until it reached 185 °C. Next, the samples were injected (1 µL) through a Hamilton® syringe (10 µL) in split system 5. The total run time was 33.5 min. Results were expressed in µmol/g.

Fecal pH determination

The pH of the feces was determined by using pH meter (Instrutherm®, modelo PH-1900). Stools were weighted (1g) and homogenized with 50 mL of milli-Q water prior to pH reading.

Fiber assessment

Ingestion of fiber was evaluated by 3-day food records on non-consecutive days, including two in weekdays and one in the weekend. All participants received previous instructions of how to describe in household units all food and beverages consumed. They were encouraged not to change their dietary pattern. The food records were reviewed by experienced dietitian. Data were assessed using version 4.0 of Avanutri® PC Revolution *software*. The reliability of the food records information were evaluated dividing the total energy of the diet by the Estimated Energy Requirements – EER (IOM, 2002). Ratio below 1.2 was considered as underestimated energy intake (WAHRLICH & ANJOS, 2001).

Statistical analysis

The differences in bacterial populations, fecal SCFAs content, pH and dietary fiber intake between CD patients and controls were determined by applying Student's *t*-test and the Mann–Whitney test for parametric and asymmetric data, respectively. Significant differences were considered at $P < 0.05$.

RESULTS

Microbiota characteristics in celiac and control subjects

Fecal microbiota was assessed by performing FC-FISH method. The comparison of fecal microbiota between CD adult patients and controls is shown in Figure 1.

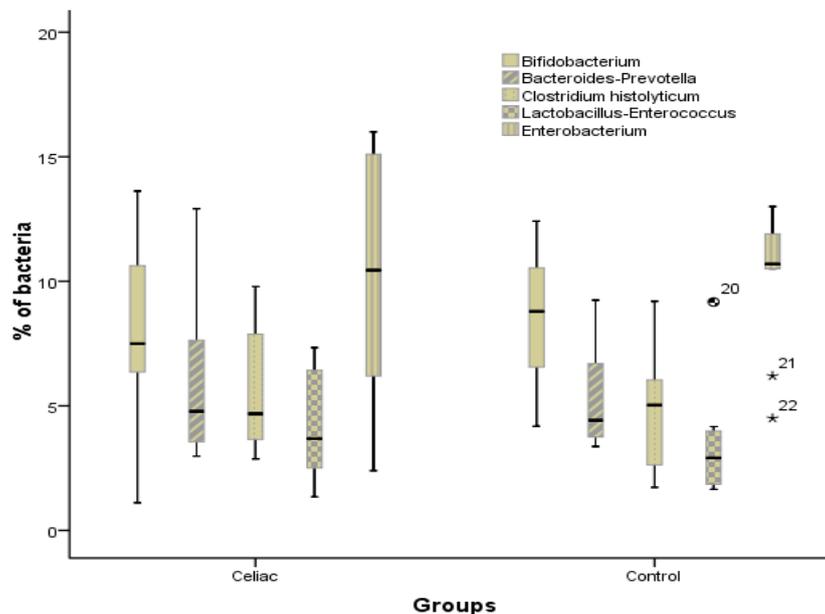


Figure 1. Percentage of the major bacterial groups as compared to the total amount of bacteria in feces from celiac adult subjects and controls and analyzed by FC-FISH. The line in the box represents the median (50th percentile), with the lower line the 25 % border (25th percentile) and the upper line the 75 % border (75th percentile). The end of the upper vertical line represents the maximum data value. The end of the lower vertical line represents the lowest value. The separate dots indicate outliers.

Enterobacterium was the highest group detected with 10.5 % (95% CI 6.9-13.9) in celiac patients and 10.1 % (95% CI 8.2-12.0) in the control group. In CD adult patients and controls, *Bifidobacterium* represented 7.9 % (95% CI 5.3-10.6) and 8.6 % (95% CI 6.9-10.4), respectively, as compared with the total amount of bacteria. Percentages of *Bacteroides-Prevotella* group were 6.3 % (95% CI 3.8-8.9) in celiac subjects and 5.1 % (95% CI 3.7-6.5) in controls. *Clostridium histolyticum* comprised 5.6 % (95% CI 3.8-7.2) and 4.7 % (95% CI 3.0-6.3) of the total bacteria in celiac and control subjects, respectively. *Lactobacillus-Enterococcus* was the lowest group present with 4.3 % (95% CI 2.8-5.8) in the celiac group and 3.4 % (95% CI 1.8-4.9) in controls. The differences in percentages of bacterial groups between celiac and healthy controls were not significant ($p>0.05$).

Bacterial numbers, represented as log cell/g of feces, did not differ ($p>0.05$) between the groups, as shown in Table 1.

Table 1. Bacterial counts (log cells/g) in fecal samples from celiac and control groups.

Bacteria	Celiac group (n=16)	Control group (n=16)	P*
	Median (IQR)	Median (IQR)	
Total bacteria	10.46 (10.45-10.60)	10.46 (10.45-10.65)	0.181
<i>Bifidobacterium</i>	9.43 (9.34-9.50)	9.48 (9.39-9.52)	0.375
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	9.24 (9.13-9.37)	9.12 (9.07-9.36)	0.355
<i>Clostridium histolyticum</i>	9.20 (9.07-9.36)	9.13 (9.02-9.23)	0.220
<i>Lactobacillus-Enterococcus</i>	9.19 (8.93-9.26)	8.94 (8.80-9.31)	0.597
<i>Enterobacterium</i>	9.63 (9.41-9.65)	9.51 (9.49-9.57)	0.616

* Mann-Whitney test. Data are represented as median with interquartile range (IQR).

Ratio of Gram-positive to Gram-negative bacteria

The Gram-positive and Gram-negative bacteria ratio is displayed in Table 2. No significant differences were found between the groups ($p > 0.05$).

Table 2. Ratio of Gram-positive (G^+) to Gram-negative (G^-) bacteria, using bacterial counts (log cells/g) and percentages (%) in celiac and control groups. Results are expressed as mean with 95 % confidence interval (95% CI).

Ratio G^+/G^-	Celiac group (n=16)	Control group (n=16)	P^*
	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	
Bacterial counts	1.48 (1.46-1.50)	1.47 (1.46-1.49)	0.684
Percentage	1.14 (0.84-1.45)	1.12 (0.95-1.30)	0.796

* Mann-Whitney test.

Fiber intake and short chain fatty acids concentration in celiac and control groups

The consumption of fiber in CD subjects was $17.2 \text{ g} \pm 4.9$ (mean \pm SD), while in controls $19.4 \text{ g} \pm 6.5$ (mean \pm SD). Although significant difference in fiber intake between the two groups was not found ($p=0.334$), lower amounts of butyric acid ($p<0.038$) and total SCFAs ($p<0.042$) were observed in the feces of celiac group, as shown in Table 3. Besides, pH was lower in healthy controls ($p=0.046$).

Table 3. Concentration ($\mu\text{mol/g}$ feces) of fecal SCFA from the celiac and control groups. Results are represented as mean \pm standard deviation (SD).

SCFA	Celiac group (n=16)	Control group (n=16)	P^*
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Acetic acid	12.6 ± 4.2	14.2 ± 4.1	0.278
Propionic acid	3.6 ± 1.4	5.7 ± 1.4	0.112
Butyric acid	2.2 ± 1.6	3.7 ± 2.0	0.038
Total SCFA**	18.5 ± 6.7	23.7 ± 6.8	0.042

* Student t-test. **Sum of acetic, propionic and butyric acid.

Correlation between fiber intake, short chain fatty acids and microbiota composition

A negative correlation between fiber intake and bacterial counts of *Enterobacterium* group ($r=-0.64$, $p=0.046$) was found in celiac subjects. In addition, acetic and propionic

acids positively correlated with *Clostridium histolyticum* group levels ($r=0.66$, $p=0.038$ and $r=0.65$, $p=0.043$, respectively) in celiac patients. In controls, butyric acid was negatively correlated with the counts of *Enterobacterium* group ($r=-0.74$, $p=0.014$). Moreover, there was a positive correlation between pH and *Bacteroides-Prevotella* group levels ($r=0.84$, $p=0.002$) in controls.

DISCUSSION

Our study is the first to characterize gut microbiota in CD adult patients under gluten free diet in Brazil. In the present study, fecal samples were used to assess the differences in the intestinal microbiota between celiac subjects and controls. Fecal sampling is a non-invasive method, which allows the inclusion of healthy volunteers (NISTAL *et al.*, 2012). We chose FC-FISH, which is a successfully and widely used method to characterize microbial groups in many clinical disorders (COLLADO *et al.*, 2008b; NADAL *et al.*, 2007, Grześkowiak *et al.* 2011). To our knowledge, the present study is the first in Brazil that uses FC-FISH method to characterize the gut microbiota.

When compared to healthy controls, no significant differences were found in feces of celiac adult individuals, according to *Bifidobacterium*, *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium histolyticum*, *Lactobacillus-Enterococcus* and *Enterobacterium* groups. The main differences in bacterial groups from feces of CD children are usually found between untreated patients and healthy controls (COLLADO *et al.*, 2007; PALMA *et al.*, 2010). This is the first study conducting bacterial group analysis in feces collected from CD adult subjects. On the other hand, there are some studies in CD children that found significant differences in treated celiac patients and healthy controls when their intestinal microbiota was compared at the level of species, which is more specific, instead of groups (COLLADO *et al.*, 2008a; COLLADO *et al.*, 2009). Moreover, other

groups of bacteria could present distinct outcomes, since the probes used are not representative of all groups of fecal bacteria.

The lack of significant difference in the bacterial groups between CD subjects and controls could be due to the dietary habits. The treatment with a strict gluten free diet often results in restoring normal mucosal histology. Palma and co-workers (2009) found that the diet with no gluten-containing products was able to modulate *Bifidobacterium* group, but not *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium histolyticum*, *Lactobacillus-Enterococcus* and *Escherichia coli* in healthy individuals that were submitted to a gluten free diet. Other factors might have also been involved, such as distinct lifestyle, Brazilian environment and the host microbiota.

In our study, statistical difference in the ratio of Gram-positive to Gram-negative bacteria was not observed. Interestingly, Palma and collaborators (2010) detected lower ratio in treated CD children when compared to controls. The decrease in beneficial Gram-positive bacteria could facilitate the growth and interactions of harmful Gram-negative bacteria, thus contributing to loss of gluten tolerance in CD patients.

It was shown that the ingestion of fiber in CD subjects was lower than in controls, although with no significance. Similarly, the group of Mariani (1998) found higher amounts of fiber intake in controls in comparison with CD adolescents. Nevertheless, the difference was not significant, which corroborates our outcomes. Surprisingly, Mariani and co-workers (1998) observed statistical difference in fiber consumption between CD adolescents under gluten free diet and those on gluten-containing products.

Fecal microbiota is able to utilize dietary fiber and consequently produce SCFA. We demonstrated that butyric acid and total SCFA were significantly lower in CD individuals, which could help in preventing mucosal inflammation and cellular proliferation (YANG *et al.*, 2013). The group of De Filippo (2010) showed significantly more SCFA and less number of sequences related to *Enterobacterium* with higher amount of fiber intake. According to Hermes and co-workers (2009), higher dietary fiber intake leads to a greater SCFA concentration, such as butyric acid, and to a reduction in species that belongs to *Enterobacterium* group. In our study, a negative association between fiber intake and bacterial counts of *Enterobacterium* was found. Yang and collaborators (2013) have demonstrated positive correlation between *Bacteroides* and propionic acid/SCFA ratio, besides *Faecalibacterium* with butyric acid/SCFA ratio.

CONCLUSION

This study shows the characterization of bacterial groups in feces of CD adult patients and the production of SCFA. In summary, bacterial groups did not differ between treated CD adult subjects and controls. However, butyric acid and total SCFA were lower in the CD group. Besides, fiber intake was negatively associated with *Enterobacterium* group. Further studies are needed in order to detect differences in bacterial species between treated CD adult individuals and controls.

REFERENCES

- AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion Biotechnology**. 12:231–236, 2001.
- COLLADO, M. C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. 8(1):9-14, 2007.

COLLADO, M. C.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalances in faecal and duodenal *Bifidobacterium* species composition in active and non-active coeliac disease. **BMC Microbiology**. 8:232, 2008. a

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; LAITINEN, K. *et al.* Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 88:894–899, 2008. b

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 107(33):14691-14696, 2010.

DI CAGNO, R.; ANGELIS, M.; PASQUALE, I.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; RICCIUTI, P.; GAGLIARDI, F.; LAGHI, L.; CRECCHIO, C.; GUERZONI, M. E.; GOBBETTI, M.; FRANCAVILLA, R. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. **BMC Microbiology**. 11:219, 2011.

GRZESKOWIAK, Ł.; COLLADO, M. C.; MANGANI, Z.; MALETA, Z.; LAITINEN, K.; ASHORN, P.; ISOLAURI, J.; SALMINEN, S. Distinct Gut Microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 54: 812–816, 2012.

GRZEŚKOWIAK, Ł.; GRÖNLUND, M. M.; BECKMANN, C.; SALMINEN, S.; VON BERG, A.; ISOLAURI, E. The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota: double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. **Anaerobe**. 18(1):7-13, 2012.

HERMES, R. G.; MOLIST, F.; YWAZAKI, M.; NOFRARÍAS, M.; GOMEZ DE SEGURA, A.; GASA, J. *et al.* Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets. *Journal of Animal Science*. 87:3569-77, 2009.

IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs): Acceptable macronutrient Distribution ranges. In: **Dietary References Intakes**. Washington, DC: The National Academy Press, 2002.

LINDFORS, K.; BLOMQVIST, T.; JUUTI-UUSITALO, K.; STENMAN, S.; VENÄLÄINEN, J.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. **Clinical and Experimental Immunology**. 152:552-558, 2008.

MARIANI, P.; VITI, M. G.; MONTOURI, M.; LA VECCHIA, A.; CIPOLLETTA, E.; CALVANI, L.; BONAMICO, M. The Gluten-Free Diet: A Nutritional Risk Factor for Adolescents with Celiac Disease? **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. 27(5):519-523, 1998.

NADAL, I.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. **Journal of Medical Microbiology**. 56:1669–1674, 2007.

NISTAL, E.; CAMINERO, A.; VIVAS, S.; RUIZ DE MORALES, J. M.; SÁENZ DE MIERA, L. E.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; CASQUEIRO, J. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. **Biochimie**. 94:1724-1729, 2012.

PALMA, G.; NADAL, I.; COLLADO, M. C.; SANZ, S. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. **British Journal of Nutrition**. 102:1154–1160, 2009.

PALMA, G.; NADAL, I.; MEDINA, M.; DONAT, E.; RIBES-KONINCKX, C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. **BMC Microbiology**. 10:63, 2010.

RIGOTTIER-GOIS, L.; LE BOURHIS, A. G.; GRAMET, G.; *et al.* Fluorescent hybridization combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyze the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. **FEMS Microbiology Ecology**. 43:237–245, 2003.

SANZ, Y.; SÁNCHEZ, E.; MARZOTTO, M.; CALABUIG, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 51:562–568, 2007.

TEIXEIRA, T. F. S.; GRZESKOWIAK, Ł.; FRANCESCHINI, S. C. C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L. L. F.; PELUZIO, M. C. G. Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. **British Journal of Nutrition**. 109, 914–919, 2013.

TJELLSTRÖM, B.; STENHAMMAR, L.; ÖGBERG, L.; FÄLTH-MAGNUSSON, K.; MIDTVEDT, T.; SUNDQVIST, T.; NORIN, E. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease, *Am. J. American Journal of Gastroenterology*. 100:2784–2788, 2005.

WAHAB, P. J.; MEIJER, J. W.; MULDER, C. J. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. **American Journal of Clinical Pathology**. 118, 459–463, 2002.

WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A. Historical and methodological aspects of the measurement and prediction of basal metabolic rate: a review. **Cadernos de Saúde Pública** 17:801–817, 2001.

VADER, L. W.; STEPNIAK, D. T.; BUNNIK, E. M.; KOOY, Y. M.; DE HAAN, W.; DRIJFHOUT, J. W.; VAN VEELLEN, P. A.; KONIG, F. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. **Gastroenterology**. 125:1105–1113, 2003.

YANG, J.; MARTÍNEZ, I.; WALTER, J.; KESHAVARZIAN, A.; ROSE, D. J. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. **Anaerobe**. 1–8, 3013.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, os grupos de bactérias não se diferiram entre celíacos e controle. No entanto, houve menores quantidades de ácido butírico e de ácidos graxos de cadeia curta total nos indivíduos celíacos. O consumo de fibras foi menor no grupo celíaco. Foi encontrada correlação negativa entre a ingestão de fibras e os níveis do grupo *Enterobacterium* no grupo celíaco. Novos estudos são necessários com o intuito de pesquisar alterações na microbiota intestinal, em nível de espécies bacterianas, e relacioná-las com as diferenças encontradas na composição dos ácidos graxos de cadeia curta.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-1269

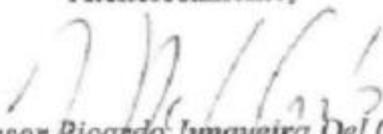
Of. Ref. Nº 146/2011/Comitê de Ética

Viçosa, 10 de outubro de 2011.

Prezada Professora:

Cientificamos V. S^a. de que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, em sua 7^a Reunião de 2011, realizada nesta data, analisou e aprovou, sob o aspecto ético, o projeto intitulado *Avaliação nutricional dos fatores de risco cardiovascular e da microbiota intestinal de pacientes adultos com doença celíaca*.

Atenciosamente,


Professor Ricardo Junqueira Del Carlo
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Vice-Presidente em exercício

Professora
Maria do Carmo Gouvêia Pelúzio
Departamento de Nutrição e Saúde

/rhs.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Nutrição e Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Estou ciente que:

Os procedimentos que serão adotados no trabalho “**Perfil Nutricional, Adequação Dietética e Marcadores Bioquímicos em Pacientes Adultos com Doença Celíaca**” de autoria de Tatiana do Nascimento Campos, Flávia Xavier Valente e Luís Fernando Moraes e orientação da Prof. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio constam da aplicação de questionários para obtenção de informações relacionadas à caracterização, atividade física e hábitos alimentares, de avaliações antropométricas não invasivas (peso, estatura, bioimpedância e densitometria óssea) e invasivas (coleta de sangue).

- Como participante do estudo não serei submetido a nenhum tipo de intervenção que possa causar danos à minha saúde, visto que as condutas a serem adotadas objetivam a promoção da mesma e são respaldadas na literatura científica.

- A minha participação é voluntária, e as informações obtidas são sigilosas e facultado a mim o afastamento do estudo se eu assim desejar, sem a necessidade de justificativa e sem que haja nenhum tipo de constrangimento ou pressão contra minha vontade.

- Minha participação neste estudo não é remunerada.

- Os dados obtidos estarão disponíveis para a equipe envolvida na pesquisa e poderão ser publicados com a finalidade de divulgação das informações científicas obtidas, sem que haja identificação das pessoas que participaram do estudo.

- Se houver descumprimento de qualquer norma ética poderei recorrer ao Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa. De posse de todas as informações necessárias:

Eu, _____ concordo em participar da pesquisa de acordo com os termos listados acima.

Viçosa, ____/____/____

Assinatura Voluntário

Assinatura pesquisador

APÊNDICE C – Questionário Geral**QUESTIONÁRIO DE PESQUISA**

Nome: _____ Sexo: () F () M

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Raça: _____

Telefone: _____ Celular: _____ Atividade profissional: _____

Dados sócio-econômicos

Até que ano estudou? _____

Classe Social (Questionário ABEP)**Quantidades de itens**

	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer	0	2	2	2	2

Grau de Instrução do chefe de família

Analfabeto / Primário incompleto	Analfabeto / Até 3a. Série Fundamental	0
Primário completo / Ginásial incompleto	Até 4a. Série Fundamental	1
Ginásial completo / Colegial incompleto	Fundamental completo	2
Colegial completo / Superior incompleto	Médio completo	4
Superior completo	Superior completo	8

Classificação

A1 (42 – 46); A2 (35 – 41); B1 (29 – 34); B2 (23 – 28); C1 (18 – 22); C2 (14 – 17);

D (8 – 13); E (0 – 7)

História social

Você faz uso de bebidas alcoólicas? () Não () Sim Qual tipo? _____

Quantidade: _____ Qual a frequência? _____

Fumante () Não () Sim nº de cigarros por dia: _____ Já foi fumante?

() Não () Sim Parou faz quanto tempo? _____

Com que frequência você se expõe ao sol? (*roupas leves com braços e pernas descobertos ao ar livre. Ex: caminhada, ida ao comércio, passeio com cachorro, transporte de bicicleta*)

() diariamente () menos de 2x /semana () mais de 2x/semana

Por quanto tempo você fica exposto ao sol? () < 15 min () > 15 min

Faz uso de protetor solar diariamente? () Não () Sim

Histórico da Doença Celíaca

Diagnóstico da DC feito em ____/____/____ com ____ anos

Exames realizados: sorologia () HLA-DQ2/DQ8 () Biópsia () Sintomas ()

Quantas biópsias? _____ Data da última biópsia __/__/__

Parente com doença celíaca: () Não () Sim Quem: _____

Sintomas antes do diagnóstico: () Não () Sim Quais: _____

Quanto tempo apresentou sintomas até o momento do diagnóstico: _____

Apresentou variação de peso após diagnóstico? () Não () Sim Quanto? _____

Quanto tempo faz tratamento com DLG? ____ Acompanhamento da DLG: () Não ()

Sim Qual profissional acompanha? _____ Frequência: _____

Apresenta sintomas com DLG () Não () Sim Quais:

() irritabilidade exagerada () diarreias prolongadas () intestino preso

() excesso de gases () barriga inchada () dor de barriga

() cansaço exagerado () dores nas juntas () aftas repetidas

() anemia resistente () dermatites () depressão

Quando consome glúten, quais sintomas você apresenta: _____

História Clínica

Apresenta alguma outra doença ou outro problema de saúde além da DC?

Diabetes	(S)	(N)	Tempo:
Hipertensão	(S)	(N)	Tempo:
Dislipidemia	(S)	(N)	Tempo:
Infarto	(S)	(N)	Tempo:
Derrame	(S)	(N)	Tempo:
Câncer	(S)	(N)	Tempo:
Tireóide	(S)	(N)	Tempo:
Depressão	(S)	(N)	Tempo:
Doença ginecológica	(S)	(N)	Qual/Tempo:
Doença hepática	(S)	(N)	Qual/Tempo:

Apresenta história na família de doença cardiovascular? () Não () Sim

Quem? _____ -

Faz uso de algum medicamento/suplemento regularmente? () Não () Sim

Quais? _____

Para mulheres acima de 45 anos

Menopausa () Não () Sim () Reposição hormonal () Não () Sim

Hábitos Alimentares

Apresenta alguma alergia a alimentos que não contem glúten? () Não () Sim

Quais: _____

Faz algum outro tipo de restrição dietética que lhe obriga a reduzir ou eliminar algum alimento? () Não () Sim Quais?

() intolerância à lactose () intolerância à sacarose () vegetariana () redução de peso Outras: _____

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Data	Peso (kg)	Estatura (m)	PC (cm)	PQ (cm)

PRESSÃO ARTERIAL

	Medida 1	Medida 2	Medida 3
Hora			
PAS			
PAD			
Avaliador			

APÊNDICE D – Questionário de Atividade Física (IPAQ)

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADES FÍSICAS – IPAQ

Nome: _____

1a - Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades vigorosas por pelo menos 10 min contínuos, como por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que faça você suar bastante ou aumentem muito sua respiração ou batimentos do coração.

Dias _____ por semana () nenhum

1b – Nos dias em que você faz essas atividades vigorosas por pelo menos 10 min contínuos, quanto tempo total você gasta fazendo essas atividades por dia?

Horas: _____ Minutos: _____

2a – Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades moderadas por pelo menos 10 min contínuos, como, por exemplo, pedalar leve ou na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que faça você suar leve ou aumentem moderadamente sua respiração ou batimentos cardíacos (por favor não inclua caminhada).

Dias _____ por semana () nenhum

2b – Nos dias em que você faz essas atividades moderadas por pelo menos 10 min contínuos, quanto tempo total você gasta fazendo essas atividades por dia?

Horas: _____ Minutos: _____

3a – Em quantos dias da semana normal, você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos em cãs no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, prazer ou como forma de exercício?

Dias _____ por semana () nenhum

4a – Estas últimas perguntas são em relação ao tempo que você gasta sentado ao todo no trabalho, em casa, na escola ou na faculdade durante o tempo livre, fazendo lição de casa, visitando amigos, lendo e sentado ou deitando assistindo televisão.

Quanto tempo por dia você fica sentado em um dia de semana?

Horas: _____ Minutos: _____

4b – Quanto tempo por dia você fica sentado no final semana?

Horas: _____ Minutos: _____

APÊNDICE E - Instruções para preenchimento dos registros alimentares

Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Nutrição e Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição



Consumo Alimentar



Registro Diário

Nome: _____

Código: _____

Por favor, mantenha este registro diário com você durante todo o tempo e utilize-o para registrar todos os ALIMENTOS e BEBIDAS que você consumir durante o dia e à noite.

Pedimos que você forneça o máximo possível de informações, pois isso possibilita maior precisão na avaliação da sua dieta.

Escreva TUDO o que você **comer ou beber** imediatamente após cada refeição ou lanche, durante todo o dia. Inclua nas anotações balas, doces, sobremesas, temperos, molhos, farinhas, etc.

Especifique o máximo possível, as QUANTIDADES dos alimentos e preparações consumidos, baseada nos utensílios da sua casa. Por exemplo: 1 colher de sopa cheia de arroz, metade de um pão francês, 2 pontas de faca de manteiga, 1 copo “tipo requeijão” de suco, etc.

Escreva como os alimentos foram preparados: FRITO, ASSADO, REFOGADO, GRELHADO, COZIDO, etc.

Inclua TUDO que for adicionado nos alimentos (açúcar no cafezinho, sal na carne, azeite na salada, margarina no pão, etc.) e suas QUANTIDADES.

Escreva também os horários das refeições e lanches.

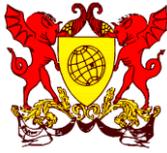
Por favor, não altere seu consumo usual de alimentos ou bebidas a fim de que o registro represente verdadeiramente a sua dieta atual.

A parte “comentários” no final serve para que você possa registrar qualquer fato relativo ao seu consumo que considere importante.

Caso você tenha alguma dúvida para preencher o registro, por favor, ligue para nós: 3899-2111 (laboratório) ou 8860-5262 (Tatiana); 8662-0687(Flávia) ou 8749-5485 (Luis Fernando). Estamos a sua inteira disposição!

Muito Obrigado!

APÊNDICE F – Formulário de retorno dos resultados aos pacientes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição
Tel.: 031 3899 2111 e-mail: tatiana.campos@ufv.br

Resultado das Avaliações Realizadas no Projeto Celíacos

Nome do Paciente

1. Avaliação da Composição Corporal pelo DEXA

Peso: ___ Kg Estatura: ___m IMC: ___kg/m² Classificação: _____

Gordura corporal: ___% do peso corporal em gordura = ___Kg.

Ideal até ___% do peso corporal em gordura = ___Kg

Massa magra = ___% do peso corporal / Tecido ósseo = ___% do peso corporal

Taxa metabólica basal: _____Kcal

2. Circunferência da cintura e relação cintura-quadril

- Medida da Cintura: ___cm = classificação
- Medida do Quadril: ___cm
- Relação cintura/quadril: ___cm = classificação

As medidas da cintura e quadril são utilizadas para verificar obesidade, uma vez que demonstram onde a gordura está acumulada. A forma como a gordura corporal se distribui pelo corpo representa um importante indicador de saúde. Assim, quem apresenta a medida da cintura aumentada, apresenta também maior acúmulo de gordura na região abdominal, o que representa risco maior de desenvolver doenças metabólicas e cardiovasculares. Indivíduos que possuem maior acúmulo de gordura na região do quadril apresentam maior risco de desenvolver artrose e varizes, além de doenças metabólicas. No entanto, não há valor de referência para este parâmetro.

De forma simplificada, indivíduos do sexo masculino devem manter o perímetro da cintura abaixo de 102 cm, sendo que o ideal seria um valor inferior a 94 cm. No caso das mulheres, recomenda-se um valor abaixo dos 88 cm e um valor ideal abaixo de 80 cm.

A relação cintura-quadril, que é obtida pela divisão da medida da cintura pela medida do quadril, define a existência de riscos metabólicos quando se encontra maior do que 1,0 nos homens e 0,85 nas mulheres.

3. Avaliação dietética

Comentários sobre a dieta (exemplo):

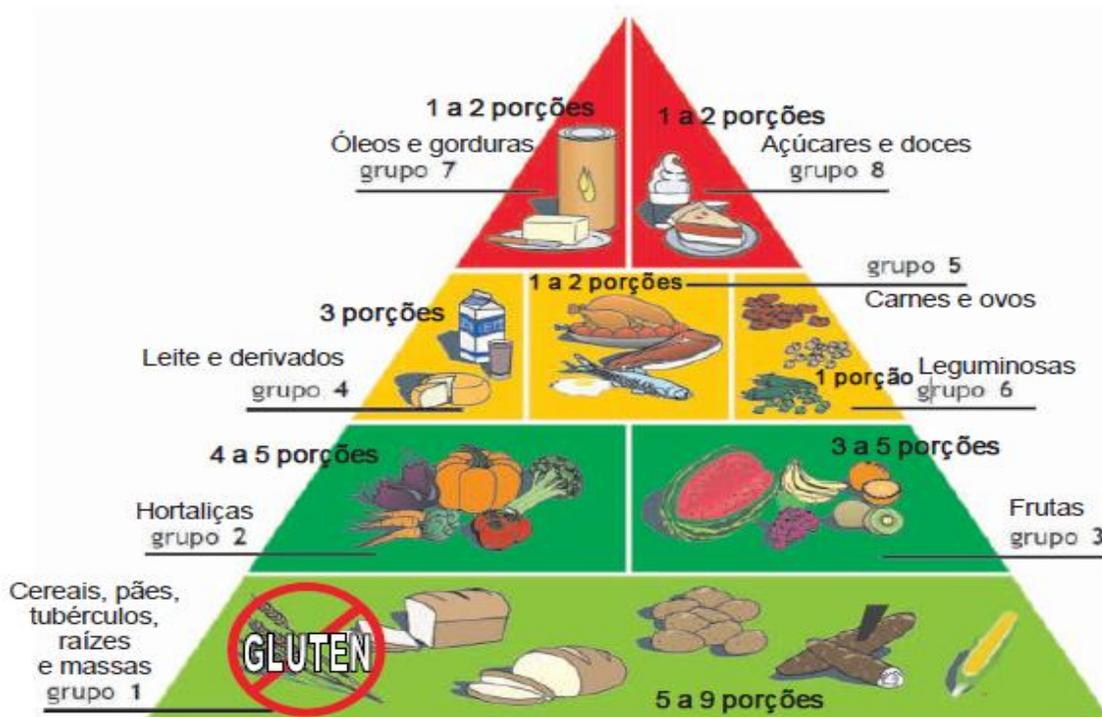
“Ao fazermos a análise da dieta foi possível observar que há um consumo muito alto de energia apesar da boa proporcionalidade de carboidratos, proteínas e lipídios. Este consumo elevado, associado a pouca atividade física pode levar ao quadro de sobrepeso/obesidade, além de desbalanços metabólicos que favorecem o aparecimento de doenças cardiovasculares. Além disso, o consumo de sódio está bastante elevado o que, isoladamente, favorece o desenvolvimento de hipertensão arterial. Recomendamos a redução do volume de alimentos ingeridos, principalmente os altamente calóricos com substituição por alimentos menos calóricos e mais saudáveis, como vegetais e frutas”.

Qualquer dúvida, estamos à disposição!

Obrigado por participar da nossa pesquisa!

APÊNDICE G – Folder para pacientes celíacos

A pirâmide alimentar também deve ser seguida pelos celíacos, fazendo a adequação e substituindo as fontes de glúten por outros alimentos.



*Dicas Iniciais
de
Alimentação Saudável
na
Doença Celíaca*

Para mais informações sobre Doença Celíaca, visite o site da
Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil - FENACELBRA:
www.doencaceliaca.com.br

Selma Menezes Dias dos Santos
Nutricionista

Alimentação Saudável Doença Celíaca

A dieta celíaca deve ser isenta em glúten para evitar reações como mal estar, vômitos, dermatite, depressão, constipação ou diarreia, artrite etc.

O Glúten não é um nutriente essencial para a manutenção da saúde, portanto, sua exclusão da dieta não implica em problemas para o organismo. A exclusão de alimentos com glúten deve ser suprida pela substituição por alimentos do mesmo grupo, mas confeccionados com cereais permitidos, que tomam a receita sem glúten semelhante em valor nutricional à com glúten.

Substitua o trigo, centeio, cevada, aveia e malte por arroz integral, trigo sarraceno, quinua, soja, milho e tubérculos como a batata, a mandioca e o inhame.

A alimentação celíaca deve ser composta com frutas e hortaliças de todos os tipos, pois além de serem ricas em fibras, oferecem vários minerais e vitaminas que auxiliam na manutenção do bom funcionamento do organismo.

Aumente o consumo de frutas oleaginosas como nozes e castanhas e também de óleos de linhaça e gergelim, azeite de oliva extra virgem.

Prefira carnes magras e opte pela ingestão de carnes brancas (peixes e aves).

Ingira bastante líquido durante o dia, de preferência água (1,5 litros a 2 litros/dia).

Dicas importantes:

Ao fazer as suas compras, fique atento aos rótulos e embalagens dos alimentos. Leia a sua composição. Por lei federal a indústria brasileira deve mencionar nas embalagens dos produtos se o mesmo contém ou não contém glúten.

Fique alerta a cada ingrediente da composição do alimento industrializado, mesmo que na embalagem conste a inscrição "Não contém glúten". Pode haver enganos (nesse caso entre em contato com o SAC da empresa para tirar a dúvida ou comunicar o erro na rotulagem).

Observe também o local onde o alimento sem glúten está armazenado no supermercado, pois não deve ficar próximo a alimentos com glúten, por risco de algum tipo de contaminação, seja pelo ar, por pacotes furados que estejam na prateleira ou outros motivos.

Lave a embalagem antes de abri-la para o consumo.

Não prepare alimentos sem glúten com os mesmos utensílios e no mesmo ambiente que alimentos com glúten são preparados, pois para contaminação cruzada são necessários apenas minúsculos traços de glúten.



Existem hoje em dia lojas e indústrias especializadas em alimentos sem glúten, o que auxilia o celíaco a não tornar a sua dieta monótona. Mas a criatividade para elaborar novas receitas e a comunicação com outros celíacos e profissionais da saúde são também importantes fatores para a manutenção de uma dieta saudável.



Farinhas alternativas

Preparação I

1kg de farinha de arroz ou creme de arroz

330g de fécula de batata

165g de araruta

Misturar tudo e guardar em potes tampados

Preparação II

3 xícaras de farinha de arroz ou creme de arroz

1 xícara de fécula de batata

½ xícara de polvilho doce

Misturar tudo e guardar em potes tampados

Use essas misturas de farinhas para preparar pães, bolos, massas, tortas etc.

APÊNDICE H – Folder para indivíduos do grupo GCO

☆ Evite pular refeições. Faça no mínimo 3 refeições grandes (café da manhã, almoço e jantar) 2 lanches.

☆ Utilize óleo vegetal para preparar as refeições.

☆ Consuma doces, frituras, refrigerantes e bebidas alcoólicas esporadicamente.

☆ Dê preferência a preparações assadas, cozidas, ensopadas, refogadas ou grelhadas.

☆ Prefira as carnes magras, brancas ou vermelhas.

☆ Retire a gordura visível dos alimentos e a pele das aves.

☆ Varie a escolha dos alimentos ao longo do dia e durante a semana. Quanto mais colorida a refeição, mais saudável e nutritiva ela será!

☆ Escolha leite e derivados semidesnatados ou desnatados.

☆ Tenha uma alimentação rica em fibras: consuma diariamente

frutas com casca e/ou bagaço, vegetais folhosos, cereais integrais associado a ingestão de líquidos.

☆ Não pule os horários das refeições e tenha horários regulares para se alimentar.

☆ Evite fumar!

Lembre-se!

Uma alimentação saudável aliada à prática de exercícios físicos regulares é essencial para evitar doenças, viver bem e com saúde!



Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Nutrição e Saúde

Elaborado por: Flávia Xavier Valente, Fernanda Drummond, Luísa C.P. Penido, Maria do Carmo G. Reluzio, Sônia M.M. Ribeiro

Viçosa - 2009

Alimentação Saudável:



Você sabe como alimentar-se bem?

Alimentação Saudável

O que é?

A alimentação saudável é entendida como aquela que faz bem, promove a saúde e previne doenças.

O segredo de uma refeição saudável está na **variedade** de alimentos e na **combinação** entre eles

ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL É:

colorida

saborosa

equilibrada

variada

não é cara

Pirâmide Alimentar



☆ É importante comer alimentos de todos os grupos, todos os dias.

☆ Nenhum grupo de alimentos é mais ou menos importante que o outro. Cada um fornece diferentes nutrientes importantes para o bom funcionamento do nosso corpo.

☆ Consuma mais alimentos dos grupos da base ou próximos a base da pirâmide e em menor quantidade os alimentos do topo ou próximos ao topo da pirâmide.

Dicas para ter uma alimentação nota 10

☆ Procure fazer suas refeições com a família ou com os amigos, apreciando sempre o momento e o sabor os alimentos;

☆ Evite comer em frente a televisão. Faça suas refeições em ambiente tranquilo e mastigue devagar. Aprecie sua refeição sem pressa.

☆ Procure conhecer e valorizar os alimentos da sua região.

☆ Inclua frutas, verduras e legumes em suas refeições. Escolha as frutas, legumes e verduras da época.

☆ Leia os rótulos dos alimentos e na escolha aqueles com baixa quantidade de gordura saturada, gordura trans, colesterol, sódio e açúcar.

☆ Beba dois litros de água por dia