

UNIVERSIDADE FEDERAL JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO - PARASITÁRIAS

**Marjorie Raquel Anariba Sarmiento**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO RESISTOMA CLINICO FECAL EM  
INDIVIDUOS EUTROFICOS, COM SOBREPESO E OBESOS**

JUIZ DE FORA

2016

**MARJORIE RAQUEL ANARIBA SARMIENTO**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO RESISTOMA CLÍNICO FECAL EM  
INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS, COM SOBREPESO E OBESOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientação:**

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (Orientador)**

**Co-orientadores:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Lúcia Silva**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Dioneia Evangelista Cesar**

**Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado**

JUIZ DE FORA

2016

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos  
Departamento de Biologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

## **COLABORAÇÃO**

Prof<sup>a</sup> . Dr<sup>a</sup>. Juliana Alves Resende  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório Côrtes Villela  
Laboratório de Análises Clínicas  
Juiz de Fora, MG

## **APOIO FINANCEIRO**

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais  
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Bendiga Dios la pródiga tierra en que nació.

Há esperança... Nós somos a esperança.

## AGRADECIMENTOS

Como posso retribuir ao Senhor toda a sua bondade para comigo? Só existe agradecimento no meu coração pela maravilhosa oportunidade que eu tive, porque Ele guiou-me cada segundo do caminho.

A mi familia, mis guerreros y mi mayor bendición. Gracias por su apoyo y amor incondicional, esta es sólo una muestra de que somos grandes y que nuestro pasado no decide nuestro futuro,

A Héctor, mi compañero, mi amigo, mi amor. Gracias por haber hecho estos años más ligeros y más felices, gracias por recordarme que todo es posible cuando uno decide que así sea.

À Organização de Estados Americanos (OEA) e à Universidade Federal Juiz de Fora, por ter aberto suas portas para mim, e me oferecer o maior presente: O conhecimento.

Ao Professor Cláudio, professora Vania e professora Dionéia, obrigada por ter acreditado em mim, mesmo sem me conhecer. Obrigada pela paciência e por abrir meus olhos a uma perspectiva diferente da vida, podem ter certeza que cada momento compartilhado é um tesouro para mim.

À Alessandra, Juliana, Carol, Michelle vocês são as melhores! Obrigada pela ajuda infinita e pela amizade, vocês são uma inspiração para mim.

À Thaís e Francis; minhas companheiras de luta, obrigada pelo carinho e pela paciência em cada dia de bancada.

À Bia, Bruna, Cinthia, Andresa, Lud, Aline; Deus escolheu vocês para serem anjos no meu caminho, obrigada por tudo. Amo vocês!

Obrigada Brasil, seu lindo!

## RESUMO

A obesidade é uma doença de grande impacto para saúde pública e está relacionada com alterações na fisiologia, com reflexo no intestino, sobretudo do ponto de vista ecológico. Nestas condições, alterações na estrutura da comunidade microbiana podem ocorrer, mas pouco se sabe sobre suas implicações no fenômeno da resistência aos antimicrobianos, que atualmente figura como uma grande ameaça à medicina moderna. É aceito que a microbiota intestinal atue como reservatório de genes de resistência. Por outro lado, a exposição a diferentes xenobióticos pode alterar a composição da microbiota e atuar como agente de pressão seletiva no intestino, selecionando bactérias resistentes. Considerando as alterações no estilo de vida, dieta e microbiota que acontecem em pacientes com excesso de peso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a ocorrência de marcadores genéticos representativos do resistoma clínico no metagenoma intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, sem história de antibioticoterapia recente. Foram avaliados 72 pacientes classificados em eutróficos, com sobrepeso e obesos, de acordo com o IMC. Medidas antropométricas, avaliação sócio-demográfica e nutricional dos pacientes foi realizada. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional a partir do DNA metagenômico fecal extraído foi utilizada para avaliar a presença de 59 genes de resistência pertencentes a diferentes famílias de antibióticos. A densidade de diferentes grupos bacterianos foi avaliada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Do total de genes pesquisados, foram detectados 27 tipos de genes, dos quais 17 genes de resistência são compartilhados entre os três grupos (eutróficos, com sobrepeso e obeso), o que indica a presença de um núcleo comum no resistoma formado principalmente por genes de resistência a tetraciclinas e beta-lactâmicos. Além disso, o grupo com obesidade que apresentou maior quantidade de genes detectados e variedade de genes (176:26), em comparação com o grupo sobrepeso (145:21) e o grupo eutrófico (132:0). A análise da densidade bacteriana mostrou principalmente a presença de bastonetes Gram negativos anaeróbios, seguido por bastonetes Gram negativos e cocos Gram positivos, os quais estiveram aumentados no grupo obeso, especialmente para *Escherichia coli* e *Acinetobacter*. Foi calculada a proporção de genes de resistência em comparação com as espécies bacterianas, mostrando uma maior probabilidade do surgimento de genes de resistência para o grupo dos bastonetes Gram negativos. Foi realizado o análise de correlação (Odds Ratio) entre os genes de resistência o IMC, ingesta calórica, consumo de xenobióticos, e uso de edulcorantes, e uma correlação positiva entre o surgimento dos genes de resistência e esses fatores foi observada. Os resultados sugerem que fatores relacionados ao excesso de peso como o IMC, dieta e a exposição a diferentes xenobióticos afetam a composição da microbiota intestinal, permitindo uma maior probabilidade da ocorrência de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma fecal.

**Palavras-chave:** microbiota intestinal, obesidade, resistência aos antibióticos

## ABSTRACT

Obesity is a disease of great impact to public health and is related to changes in physiology, reflected in the gut, especially from an ecological point of view. Under these conditions, changes in microbial community structure may occur, but little is known about its implications in the antimicrobial resistance phenomenon, which currently ranks as a major threat to modern medicine. It is accepted that the intestinal microbiota acts as resistance genes reservoir. Moreover, exposure to different xenobiotics can change the composition of the microbiota and act as an agent of selective pressure in the intestine selecting resistant bacteria. Considering the changes in lifestyle, diet and microbiota that happen in overweight patients, the objective of this research was to evaluate the occurrence of genetic markers representative of the clinical resistoma in the gut metagenome of normal weight, overweight and obese individuals, with no history of recent antibiotic therapy. 72 patients were evaluated and classified as normal weight, overweight and obese according to BMI. Also, anthropometric, sociodemographic and nutrition evaluation of patients was performed. Conventional polymerase chain reaction (PCR) from the fecal metagenomic DNA extracted was used to assess the presence of 59 resistance genes belonging to different families of antibiotics. The density of different bacterial groups was assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH). Of the total surveyed genes were detected 27 types of genes, of which 17 resistance genes are shared among the three groups (normal weight, overweight and obese), which indicates the presence of a common core in resistoma mainly made up of genes that confere resistance to tetracyclines and beta-lactams. Moreover, the obese group presents the highest amount of detected genes and variety of genes (176:26), compared to the overweight (145:21) and eutrophic group (132:0). The bacterial density analysis showed mainly the presence of Gram negative anaerobes, followed by Gram negative rods and Gram positive cocci, which were increased in the obese group, particularly *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*. Also, was calculated the ratio of resistance genes in comparison with the bacterial species showing more likely the emergence of resistance genes for the group of Gram negative rods. We performed the correlation analysis (odds ratio) between resistance genes BMI, caloric intake, consumption of xenobiotics, and use of sweeteners, and a positive correlation between the emergence of resistance genes and these factors was observed. The results suggest that factors related to overweight as BMI, diet and exposure to different xenobiotics affect the composition of the intestinal tract, allowing for a greater likelihood of genetic markers of antimicrobial drug resistance in fecal metagenome.

Keywords: Antimicrobial resistance, intestinal microbiota, gut, faecal resistome

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág

- Fluxograma 1: Representação esquemática da estratégia experimental para o estudo de ocorrência de genes de resistência bacterina às drogas no metagenoma intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos e sua correlação com ocorrência de grupos bacterianos de interesse e características antropométricas, sociodemográfica e nutricional dos indivíduos. 39
- Quadro1. Agrupamento dos marcadores de resistência a drogas antimicrobianas avaliados e os grupos bacterianos relacionados a eles. 54
- Figura 2. Média da ingestão de grupos de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos em estudo. 59
- Figura 3. Distribuição de medicamentos e suplementos alimentares em uso pelos indivíduos dos grupos em estudo, segundo declaração durante o inquérito nutricional. 60
- Figura 4. Distribuição de edulcorantes em uso pelos indivíduos dos grupos em estudo, segundo declaração durante o inquérito nutricional. 61
- Figura 5. Avaliação comparativa da quantidade de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas amplificados a partir metagenoma fecal, representativo do resistoma clínico dos indivíduos. 62
- Figura 6. Distribuição de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas avaliados a partir metagenoma intestinal, representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. 63
- Figura 7. Ocorrência de marcadores genéticos, por grupo farmacológico de drogas antimicrobianas, entre os diferentes grupos, amplificados a partir metagenoma intestinal representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. 64

Figura 8. Diagrama de Venn com a distribuição dos marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas amplificados a partir metagenoma fecal, representativo do resistoma clínico dos indivíduos. 65

Figura 9. Densidade bacteriana relativa detectada a partir do metagenoma fecal, de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos. 66

Figura 10. Densidade bacteriana relativa dos diferentes grupos taxonômicos detectados a partir do metagenoma fecal, de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos. 67

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>Pág</b>
Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados	45
Tabela 2. Marcadores específicos utilizados para análise da composição da comunidade bacteriana por FISH	52
Tabela 3. Características sócio-demográficas dos participantes	56
Tabela 4. Características antropométricas dos participantes	57
Tabela 5. Correlação entre os parâmetros nutricionais dos pacientes e os marcadores de resistência detectados	65
Tabela 6. Razão entre o número de detecções de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, e a frequência relativa da densidade dos diferentes grupos bacterianos associados a esses marcadores.	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization* (Hibridação Fluorescente *In Situ*)

HDL: *High density lipoprotein*

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IMC: Índice de masa corporal

LDL: *Low density lipoprotein*

LPS: Lipopolissacarídeo

MG: Minas Gerais

MLS: Macrolídeos, lincosamida e streptoGramina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

QQFA: Questionário de frequência alimentar

TBE: Tris Borato EDTA

UFJF: Universidade Federal Juiz de Fora

UV: Ultra Violeta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Microbiota Intestinal: homeostase e disbiose.....	16
2.2 Antimicrobianos e Resistência Bacteriana .....	20
2.2.1 O Resistoma .....	23
2.2.3 O Resistoma fecal.....	25
2.3 Obesidade.....	28
2.4 Obesidade e microbiota intestinal .....	30
2.4 Metabólitos e Xenobióticos no Intestino .....	32
2.5 Justificativa .....	35
3 OBJETIVOS .....	37
3.1 Objetivo Geral .....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Delineamento Experimental .....	39
4.2 Seleção de pacientes, coleta e preparo de amostras. ....	40
4.3 Extração de DNA das amostras fecais.....	42
4.3 Detecção dos genes de resistência .....	43
4.4 Avaliação quantitativa e qualitativa das espécies bacterianas por hibridização fluorescente in situ (FISH).....	50
4.5 Análise estatística .....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Características Sócio-demográficas, antropométricas e nutricionais dos participantes.....	55
5.2 Detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos.....	62
5.3 Avaliação quantitativa de espécies bacterianas por FISH .....	66

5.4 Relação entre os parâmetros clínico-epidemiológicos e nutricionais, distribuição de grupos bacterianos e os marcadores de resistência a drogas observados nos metagenomas obtidos.....	68
7. DISCUSSÃO.....	70
8 CONCLUSOES.....	79
9 REFERENCIAS.....	80
8	
Anexos.....	100
8.1 Anexo 1: Parecer Cosubstanciado do CEP.....	100
8.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	102
8.3 Anexo 3: Ficha de anamnese e dados cadastrais.....	104
8.4 Anexo 4. Questionário quantitativo de frequência alimentar .....	107

# 1 INTRODUÇÃO

Os avanços científicos relacionados ao estudo dos microrganismos associados a superfícies internas e externas de hospedeiros, definidos como microbiota residente, tem permitido uma compreensão mais profunda do papel desses microrganismos na manutenção do estado geral de saúde dos seus hospedeiros. Neste contexto, sabe-se que a microbiota intestinal participa de várias funções vitais para a fisiologia de seres humanos e outros animais. Além disso, a microbiota coexiste em um ambiente extremamente complexo, com relações ecológicas bem definidas entre os procariotos, células intestinais e o comportamento do hospedeiro, representado pela sua fisiologia e pelo fluxo de substâncias ou seus metabólitos, que atuam como substrato para estes microrganismos anfibióticos.

A análise da microbiota intestinal permitiu ainda estabelecer grupos bacterianos relativamente fixos em determinadas condições fisiológicas nesse ambiente, e os benefícios que estão associados a eles. No entanto, esta relação benéfica pode ser afetada se a microbiota é alterada. Esta condição de quebra na homeostase é conhecida como disbiose, e pode ser causada por vários fatores, como a dieta, localização geográfica e principalmente o uso de antibióticos. Além disso, a disbiose pode estar associada com o desenvolvimento de diferentes doenças, tais como o diabetes, a síndrome metabólica e obesidade.

O ecossistema intestinal representa um ambiente polimicrobiano susceptível a ação de diferentes xenobióticos, como as drogas antimicrobianas, cuja exposição em níveis terapêuticos ou sub-terapêuticos pode influenciar na seleção de marcadores de resistência. Como um todo, o conjunto dos marcadores de resistência presentes em

uma dada população microbiana é definido como resistoma e os genes de resistência a antibióticos de importância clínica é conhecido como o resistoma clínico, e seu estudo é fundamental para compreensão do papel dos diferentes ecossistemas como reservatórios de resistência, e as condições que levam às diferentes formas de pressão seletiva, que contribuem para sua persistência na ausência de antimicrobianos, o que pode impactar a terapêutica em situações de doenças infecciosas.

Atualmente, a contenção do fenômeno da resistência aos antibióticos representa um dos grandes desafios na saúde pública, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde. Assim, o estudo dos fatores relacionados à resistência aos antimicrobianos e seus reservatórios é fundamental e poderá permitir melhor entendimento sobre a origem, causas e fatores ambientais envolvidos na propagação deste fenômeno, o que poderá contribuir no desenvolvimento de novas estratégias, medicamentos e medidas de controle que permitam um futuro melhor para a população em geral.

Embora o intestino seja descrito como um dos maiores reservatórios de genes de resistência, e constitui um ambiente propício para a transferência desses marcadores entre bactérias, a influência de condições fisiológicas do hospedeiro que resultem em rompimento da homeostase intestinal, como a obesidade, permanece ainda não elucidada. Estudos recentes apontam a microbiota intestinal como importantes componentes participantes da fisiopatologia da obesidade, à medida que os microrganismos atuam no superávit energético para o hospedeiro, interferem com a permeabilidade intestinal, com o trânsito e degradação de substâncias, especialmente no intestino grosso, além de modularem localmente e sistemicamente padrões imunológicos do hospedeiro.

Neste sentido, considerando-se a necessidade de contenção do fenômeno da resistência bacteriana às drogas e o entendimento da influência das condições fisiológicas que possam estar relacionadas a este fenômeno; é necessário o conhecimento de fatores bióticos e abióticos que possam atuar como fatores de pressão seletiva para seleção e persistência de marcadores de resistência. Essa abordagem pode contribuir para novas estratégias terapêuticas e a minimização dos impactos associados.

Neste estudo, com uma abordagem independente de cultivo, pretendeu-se investigar a influência do estado de obesidade na persistência de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas no ecossistema intestinal, representado pelo metagenoma fecal, comparativamente em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microbiota Intestinal: homeostase e disbiose

O corpo humano depende da presença dos microrganismos para desenvolver características fisiológicas essenciais para a sua sobrevivência, co-evoluindo e mantendo a estabilidade e o equilíbrio ecológico dinâmico com a população microbiana. A maioria desses microrganismos é residente, e são definidos como populações microbianas de maior ou menor complexidade, estáveis em determinadas áreas anatômicas, considerando-se idade, fisiologia e o comportamento dos hospedeiros (XU e GORDON, 2003; GRICE e SEGRE 2012).

Esses microrganismos, também chamados de microbiota residente, indígena ou autóctone, possuem importantes funções para a saúde dos hospedeiros, uma vez que atuam como barreiras contra instalação de microrganismos patogênicos, modulam o sistema imunológico, produzem ou degradam substâncias prejudiciais ou úteis aos hospedeiros, e, ainda, podem participar do seu metabolismo energético (QIN et al., 2010).

Como um todo, o chamado microbioma, que compreende o total de genes da microbiota de um dado indivíduo, contém genes responsáveis por funções bioquímicas essenciais para a fisiologia do hospedeiro. É considerado um órgão multifuncional adquirido, e coexiste, assim, em uma relação homeostática com seu hospedeiro (O'HARA e SHANAHAN, 2006; HOOPER, LITTMAN e MACPHERSON, 2012).

Nos seres humanos e outros animais de sangue quente, o trato gastrointestinal representa um ecossistema peculiar de interação entre microbiota e seus hospedeiros

pela quantidade e diversidade de microrganismos nas diferentes porções anatômicas. Neste sítio, observam-se diferentes formas de pressão seletiva e aporte nutricional disponíveis para os microrganismos, cuja população microbiana é estimada em 100 trilhões de células (LEY, PETERSON e GORDON, 2006). O cólon está associado ao maior número e diversidade de microrganismos, com estimativas de  $10^{11} - 10^{12}$  cél/ml do conteúdo intestinal (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998). Além disso, acredita-se que esses microrganismos, em conjunto, totalizem em seus genomas em torno de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (SOMMER e BACKHEAD, 2013).

A microbiota intestinal exerce várias funções sobre a fisiologia de seu hospedeiro, tais como: (i) processamento de componentes alimentares não digeríveis, principalmente carboidratos, que são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato) (QUIN et al., 2010; SCHEPPACH, 1994); (ii) síntese de fatores nutricionais, tais como vitaminas e aminoácidos (TAN e O'TOOLE, 2015); (iii) processamento de xenobióticos; (iv) desenvolvimento e maturação do sistema imune (KABAT, SRINIVASAN e MALOY, 2014); (v) renovação do epitélio intestinal e manutenção da sua integridade; (vi) e resistência à colonização (SOMMER e BACKHEAD, 2013). Além disso, acredita-se que a microbiota intestinal possua outras funções ainda não bem estabelecidas, como papel auxiliar na síntese de metabólitos disponibilizados aos hospedeiros (FISCHBACH, WALSH e CLARDY, 2007).

No intestino, a variabilidade taxonômica microbiana, entretanto, é maior que a variabilidade funcional. Acredita-se que o número de espécies bacterianas varia entre 1.000 e 1.500, das quais 160 são amplamente compartilhadas, definindo-os como um "núcleo comum" entre os indivíduos adultos com microbiota estável (QUIN et al 2010). Nesta situação, a microbiota intestinal estável nos seres humanos é representada, majoritariamente, pelos filos *Bacteroidetes* (20-25%), *Firmicutes* (60–65%),

*Proteobacteria* (5-10%), *Actinobacteria* (3%), e em menor quantidade, bactérias do filo *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* (WOPEREIS et al., 2010 ; ROSENBAUN, KNIGHT e LIEBEL, 2015). Apesar disso, todas as funções necessárias são realizadas no trato gastrintestinal, o que indica que essas variações não afetam funcionalmente o microbioma. Porém, essas diferenças podem afetar a eficácia da função realizada (MARCHESI et al., 2015). Além disso, microbiota intestinal apresenta um caráter anfibiótico e pode estar associada a doenças infecciosas de origem endógena, geralmente polimicrobianas, em situações de desequilíbrio ou ao alcançar sítios não colonizados (UNDERWOOD, 2014; AL-SAFFAR et al., 2015). Já foi demonstrado que as alterações na microbiota (disbiose) também têm um papel importante no aparecimento de várias doenças, não só no intestino, mas também em órgãos distantes, como resultado da ruptura do equilíbrio na comunidade microbiana e na homeostase atingida pelo hospedeiro (SUN e CHANG, 2014; BEIRAO et al., 2014).

Esse desequilíbrio, conhecido como disbiose, é um termo que foi utilizado pela primeira vez em 1900 por Elie Metchnikoff para descrever alterações na fisiologia dos hospedeiros em função de mudanças na microbiota. De acordo com Hawrelak e Myers (2004), a disbiose pode afetar o hospedeiro devido a: (i) mudanças qualitativas e quantitativas na microbiota; (ii) alterações em suas atividades metabólicas e; (iii) alterações na distribuição das bactérias no intestino, o que resulta em mudanças na diversidade e metabolismo bacteriano, com aumento de bactérias potencialmente patogênicas.

A disbiose está associada a muitas doenças importantes, como câncer de cólon, doença inflamatória intestinal, enterocolite necrotizante, síndrome metabólica, doenças reumáticas, alergias, doenças cardíacas, asma, ovário policístico, diabetes, esquizofrenia e obesidade (RUSELL et al., 2012; TREMELLEN e PEARCE, 2012;

ZHANG e ZHANG, 2013; SEVERANCE et al., 2013; UNDERWOOD, 2014; BIEDERMANN e ROGLER, 2015). Portanto, é aceito que o conhecimento gerado através do estudo da microbiota intestinal e as doenças relacionadas a sua alteração poderá servir para um melhor conhecimento da fisiopatologia das doenças e desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento (NICHOLSON, HOLMES e WILSON, 2005).

Estudos recentes sobre composição e função da microbiota intestinal utilizaram como parâmetro populações indígenas peculiares, como os índios da tribo Yanomami na Amazônia venezuelana, os quais não tinham tido contato anterior com pessoas fora da sua comunidade. Os autores demonstraram a maior diversidade e funcionalidade genética descrita em um grupo humano, indicando o impacto da vida moderna das populações humanas na microbiota (CLEMENTE et al., 2015). Assim, acredita-se que a microbiota residente é dinâmica e, como outros componentes microbianos autóctones, pode ser influenciada por fatores como sexo, a idade, região geográfica, condição imunológica e comportamento. Acredita-se ainda, que esses fatores possam afetar a simbiose entre a microbiota e seu hospedeiro, alterando a fisiologia do hospedeiro, e conseqüentemente, seu estado geral de saúde. Em alguns casos, pode contribuir negativamente, tanto local, como sistemicamente (PHAM e LAWLEY, 2014; YATZUNENKO et al., 2012).

O desenvolvimento e diversificação da microbiota intestinal é um processo complexo que começa com o nascimento. A colonização inicial é crucial para o desenvolvimento e maturação das características do sistema imunológico, de modo que doenças tais como asma, diabetes e obesidade podem estar relacionadas com mudanças na microbiota (COX et al., 2014; WOPEREIS et al., 2014; RUSSELL et al., 2012). Estudos de análise do mecônio e da placenta tem mostrado a presença de

DNA de bactérias do gênero *Bifidobacterium* de procedência intestinal, o que sugere uma transferência vertical deste material e o começo dos estímulos bacterianos no corpo humano antes do nascimento (JIMENEZ et al., 2008; SATOKARI et al., 2009).

Após o nascimento, a implantação da microbiota, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, está relacionada, sobretudo, ao modo de alimentação do recém-nascido e ao ambiente que ele vive (FALLANI et al., 2011). Theodore Escherich, um dos pioneiros no estudo da microbiota em crianças, mostrou que a colonização intestinal está diretamente relacionada com o meio ambiente nas primeiras 3 -24 horas após o nascimento, e modifica-se ao longo do desenvolvimento da criança (SHULMAN, FRIEDMANN e SIMS, 2007). Assim, a microbiota vai se diversificando cada vez mais, até alcançar uma microbiota mais estável e próxima à da vida adulta, sendo estabelecida em torno de 2,5 anos (KOENIG et al., 2010).

## **2.2 Antimicrobianos e Resistência Bacteriana**

Antimicrobianos são compostos que matam (bactericidas) ou inibem o crescimento do microrganismo (bacteriostáticos). O termo antimicrobiano inclui compostos produzidos naturalmente pelos microrganismos como moduladores nas comunidades microbianas (antibióticos) e também compostos sintéticos ou semi-sintéticos ou produzidos pela indústria farmacêutica (quimioterápicos). A resistência antimicrobiana é a capacidade que os microrganismos tem de se multiplicar em presença de drogas antimicrobianas, em concentrações iguais ou superiores às doses terapêuticas (WHO, 2001).

De acordo com Gillings e Stokes (2012), os antibióticos representam diversas famílias estruturais e moleculares com a capacidade de inibir o crescimento

bacteriano em altas concentrações. São considerados moléculas sinalizadoras e de comunicação bacteriana, e só tem funções antimicrobianas em concentrações muito mais altas do que aquelas necessárias para desempenhar a sua função original (DANTAS, 2008). Seus efeitos podem ser diferentes dependendo das concentrações em que se encontram no ambiente, e esta característica é definida como hormese (ROMERO et al., 2011).

A maioria dos antibióticos são produtos secundários do metabolismo bacteriano, e sua síntese é ativada durante momentos de estresse, como escassez de nutrientes, ativando as vias metabólicas que produzem estes metabólitos. Nos diferentes ecossistemas, a função destas moléculas pode variar desde matar ou inibir os competidores até modular o crescimento e a morfologia bacteriana (DEMANECHE et al., 2008).

Análises dos genomas bacterianos sugerem que apenas 1% do arsenal antimicrobiano entre os microrganismos foi descrito, e a maior parte destas substâncias são naturalmente produzidas nos processos fisiológicos microbianos (FISCHBACH, 2009; OSBOURN, 2010). Os grupos de genes (clusters) que codificam esses metabólitos podem não ser expressos (crípticos) em condições de laboratório que não forneçam as condições para desencadear sua expressão (FISCHBACH, 2009).

O solo, um dos maiores reservatórios de resistência, é ao mesmo tempo o habitat de bactérias produtoras de antibióticos, principalmente bactérias do gênero *Actinomyces*, que são as responsáveis pela produção de 80% dos antimicrobianos utilizados na prática clínica (D’COSTA, GRIFFITHS e WRIGHT, 2007). Paradoxalmente, as bactérias que vivem nestes ambientes coexistem na presença de doses sub-terapêuticas de antibióticos, utilizando-os como vias de comunicação e

regulação genética entre espécies. Além disso, concentrações sub-terapêuticas de alguns antimicrobianos, como os beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, podem induzir a produção de biofilmes (ROMERO et al., 2011), e sugere-se que as bactérias tem diversificado seu repertório genético para responder eficazmente a certas moléculas, dependendo do ambiente em que se encontram (WRIGHT, 2007).

Do ponto de vista biotecnológico e médico, os antimicrobianos são, provavelmente, o recurso quimioterapêutico de maior sucesso desenvolvido no século XX. Desde a sua instituição como suporte terapêutico, as drogas antimicrobianas têm reduzido a mortalidade, mas não a persistência de doenças infecciosas. Além disso, esses agentes antimicrobianos sejam naturais ou sintéticos apresentam efeitos ecológicos (OSBOURN, 2010), principalmente atuando como agentes de pressão seletiva, que aliada à habilidade de rápida replicação das bactérias e da transferência horizontal de genes, faz da multirresistência bacteriana um fato inevitável (WRIGHT, 2007). Assim, a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos é um problema global de saúde pública (FAO/OIE/WHO, 2003; ASM, 2009).

A introdução da penicilina no início dos anos 40, indicada na terapêutica de infecções estafilocócicas, marca o início de uma nova era (TAVARES, 2000). No entanto, linhagens do gênero *Staphylococcus* resistentes à penicilina foram rapidamente detectadas, e dez anos depois, cerca de 50 a 60% dos isolados tornaram-se resistentes (CDC, 2002; LIVERMORE, 2003)

O fenômeno da multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre linhagens bacterianas hospitalares, e têm incluído além da resistência à oxacilina e a outros beta-lactâmicos, também a resistência à eritromicina, clindamicina, tetraciclina, clorafenicol, rifampicina, aminoglicosídeos e quinolonas (PEACOCK, 2005). Os microrganismos podem ser resistentes por

mecanismos intrínsecos ou adquiridos (POIREL, BONINN e NORDMANN, 2011), resistência adaptativa (BRAOUDAKI e HILTON, 2004), co-resistência (SCHWABER et al., 2005) e resistência cruzada (CHUANCHUEN et al., 2001).

Atualmente, microrganismos conhecidos como "super bactérias" tais como *Staphylococcus aureus* MRSA, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* KPC, causam milhares de mortes por ano, tornando a resistência bacteriana aos antimicrobianos um grave problema de saúde pública (WHO, 2014; CARLET et al., 2012).

### **2.2.1 O Resistoma**

O desenvolvimento de técnicas microbiológicas independentes de cultivo revelou uma nova abordagem para o conhecimento dos determinantes genéticos relacionados à resistência aos antibióticos (GRICE e SEGRE, 2012), e revelou o impacto que tem produzido o surgimento deste fenômeno (GILLINGS e STOKES, 2012). As terapias antimicrobianas foram concebidas para tratar os agentes patogênicos em situações específicas, mas a sua utilização tem um impacto ambiental significativo, cujo principal efeito é atuar como um agente de pressão seletiva, motivando a evolução dos microrganismos em direção à resistência. Além disso, outros agentes antimicrobianos, como biocidas e desinfetantes, também desempenham essa função (GILLINGS, PAULSEN e TETU, 2015). Porém, o surgimento de genes de resistência em ambientes que não são afetados diretamente pela presença de antibióticos ainda não é claro (SENGUPTA, CHATTOPADHYAY e GROSSART, 2013)

O microbioma humano interage com o pangenoma bacteriano, é a totalidade de genes presentes em todos os genomas de todos os procariotas na biosfera (GILLINGS, 2013), e alguns autores descreveram que a troca genética é tão intensa que o mundo bacteriano pode ser visto como um grande organismo multicelular, no qual as células trocam seus genes com facilidade (LEVY, 1998). A porção do pangenoma que contém os genes de resistência destes microrganismos é chamado resistoma, e inclui todas as bactérias, sejam patogênicas ou comensais, em qualquer ambiente do planeta. (FORSLUND et al., 2014) e os genes de resistência à antibióticos de importância clínica que estão dentro do resistoma, são definidos como o clínico. Análises metatranscriptômicas realizadas por Versluis et al. (2015) mostraram a expressão de genes de resistência em condições naturais, em diferentes ambientes e cuja presença não está relacionada com a presença de metabólitos secundários relevantes, e que constituem um reservatório importante para bactérias patogênicas.

O resistoma pode ser classificado em intrínseco e ambiental. O resistoma intrínseco refere-se aos genes chamados de pré-resistência, que fazem parte das vias metabólicas bacterianas e que eventualmente podem participar na resistência aos antibióticos. Além disso, também podem tornar-se genes de resistência reais sob a pressão seletiva adequada. Uma vez que estes determinantes atingem ambientes humanos ou relacionados com atividades humanas, como resultado da contaminação por xenobióticos, sofrem uma aceleração no seu processo de seleção, tornando-se genes de resistência (PERRY e WRIGHT, 2014). Portanto, o conceito de resistoma intrínseco permite expandir nossa compreensão dos mecanismos de resistência potenciais e também como os efeitos na produção de antibióticos influenciam o

desenvolvimento destes mecanismos, atuando como agentes selecionadores (FAJARDO et al., 2008).

O resistoma ambiental constitui um grande reservatório de resistência aos antibióticos e está distribuído globalmente, mesmo em lugares sem atividade humana. D'costa et al. (2006) mostraram que diferentes espécies de *Actinomycetes* são resistentes a todos os tipos de antibióticos disponíveis comercialmente, incluindo os mais recentes. Isso demonstra que estes determinantes existem há muito tempo e que podem ser transferidos no seu ambiente por meio de mecanismos de transferência horizontal (PERRY, WESTMAN e WRIGHT, 2014). Essa seleção será acelerada na presença de ambientes com atividades humanas (GALAN et al., 2013).

### **2.2.3 O Resistoma fecal**

A administração de antibióticos é capaz de produzir alterações profundas na microbiota intestinal, principalmente a perda de diversidade microbiana e da resistência à colonização. Os sítios disponíveis podem ser ocupados por bactérias resistentes que previamente encontravam-se em baixas concentrações, ou até mesmo por bactérias patogênicas. Os efeitos dessas alterações dependerão de fatores como o espectro do agente antimicrobiano; a dose e duração do tratamento; a via de administração e as propriedades farmacocinéticas da droga (JERNBERG et al., 2010). Fouhy et al. (2012) demonstraram que recém-nascidos tratados com gentamicina e ampicilina apresentaram diminuição de bactérias benéficas do intestino, como as bifidobactérias e lactobacilos, que foram substituídas por proteobactérias, ricas em elementos genéticos móveis envolvidos na resistência aos antibióticos (BAQUERO, TEDIM e COQUE, 2013).

As bactérias que habitam normalmente o intestino de seres humanos e de outros animais carregam a maioria dos determinantes genéticos. Este reservatório de genes de resistência aos antibióticos denomina-se resistoma fecal, que é definido por Dantas e Sommer (2012) como um sistema aberto que é alterado constantemente pela transferência de determinantes de resistência entre as espécies bacterianas por meio de elementos genéticos móveis. Este processo é agravado pelo tratamento oral com antibióticos de amplo espectro, que tem efeito também nas bactérias comensais, enriquecendo o reservatório de genes de resistência disponível para os patógenos (WILLMAN et al., 2015). No intestino, as bactérias compartilham genes de resistência e podem receber e doar esses determinantes a bactérias transitórias (LESTER et al., 2006; LINDBERG et al., 2000; NAKAO et al., 2014). Além disso, no intestino estão presentes bactérias anfibióticas, como *Escherichia coli*, *Clostridium spp.* e *Enterococcus spp.*, que também podem doar e receber material genético, além de causar infecções, tais como bacteremia, endocardite, contaminação cirúrgica, entre outras (TACONELLI, 2012).

No entanto, sabe-se pouco sobre a presença de genes de resistência no intestino na ausência de estímulo. Estudos realizados por Moore et al. (2015) mostraram que o resistoma fecal é estabelecido entre um a dois meses após o nascimento, e seu enriquecimento está associado com fatores relacionados ao ambiente de criança. Além disso, já foi descrito o resistoma fecal de populações indígenas isoladas que não tem recebido tratamento antibiótico, indicando que os genes são mantidos na ausência de pressão seletiva atribuída pelos antibióticos (CLEMENTE et al., 2015). Já foi demonstrado que esses genes não estão relacionados com sínteses de metabólitos secundários, o que indica que eles

poderiam ser expressos constitutivamente e realizar outras funções, além da resistência aos antibióticos no intestino.

De acordo com Ruppé e Andremont (2014), o resistoma fecal pode ser dividido em resistoma residente, que é composto pelos genes de resistência naturalmente presentes nos membros permanentes da microbiota intestinal, tais como os do gênero *Bacteroides*; e resistoma variável, composto de genes exógenos de bactérias transitórias ou adquiridos por transferência horizontal. Esses elementos móveis de transferência genética presentes em procariotas formam parte do mobiloma, e são responsáveis pela manutenção e transferência horizontal de genes de resistência na microbiota intestinal (SALYERS, GUPTA e WANG, 2004).

Os três principais mecanismos de transferência horizontal de genes são a conjugação, a transformação e a transdução. A conjugação é o principal mecanismo de transferência horizontal no intestino, e permite a transferência de material genético, como plasmídeos, transposons e integrons (ARUTYUNOV e FROST, 2013). É aceito que a conjugação seja altamente importante para disseminação de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias intestinais, com grande impacto na prática clínica (SHOEMAKER et al., 2001).

A transformação permite a recepção de DNA plasmidial e cromossômico, por isso é um mecanismo importante na evolução dos microrganismos. Neste processo, as células bacterianas podem capturar o DNA livre no ambiente e incorporá-lo no seu genoma. Estima-se que existem pelo menos 80 espécies que utilizam este processo, dos quais, pelo menos 12 são patogênicas, isolados no ambiente clínico (LORENZ e WACKERNAGEL, 1994).

A transdução é outro mecanismo importante envolvido na aquisição de genes de resistência, no qual os bacteriófagos desempenham um papel crucial na transferência de material genético (MUNIESA, LLUCH e JOFRE, 2013).

### **2.3 Obesidade**

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que apresenta um risco para a saúde (WHO, 2014),

Estima-se que em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos. Além disso, o número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo poderia chegar a 75 milhões, caso nada seja feito (ABESO, 2015). Uma das formas de se diagnosticar a obesidade é a avaliação do índice de massa corporal (IMC), que mede a relação peso/altura do indivíduo. Um indivíduo com um IMC de 30 ou mais é geralmente considerado obeso, enquanto uma pessoa com um IMC igual ou superior a 25 apresenta sobrepeso (LIN et al., 2002).

De acordo com o relatório global de doenças não transmissíveis da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014), a prevalência mundial da obesidade duplicou-se entre 1980 e 2014, e atualmente o Brasil ocupa a quinta posição mundial em relação a esta doença. De acordo com pesquisas realizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, 52.5% da população do Brasil está na faixa de sobrepeso, e 17.9% podem ser caracterizados como obesos. Além disso, 3,4 milhões de mortes por ano estão relacionadas com a obesidade, com alta concentração de casos na região das Américas (LIM et al., 2014).

A obesidade tem causas multifatoriais relacionada com fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais (REF). Acredita-se que fatores

genéticos podem estar relacionados à eficiência no aproveitamento, armazenamento e mobilização dos nutrientes ingeridos, ao gasto energético, em especial à taxa metabólica basal, ao controle do apetite e ao comportamento alimentar (SCHIERRI et al., 1994). A obesidade pode estar associada também a algumas desordens endócrinas, como o hipotireoidismo e problemas no hipotálamo (GIGANTE et al., 1997). Além disso, as pessoas que referem obesidade materna e paterna apresentaram risco quase duas vezes mais alto de tendência à obesidade do que aqueles cujos pais não são obesos (MOTTA et al., 2004). O crescimento acelerado da obesidade nas populações tem destacado a modernização das sociedades, a qual tem provocado mais oferta de alimentos aliada à melhoria das formas de trabalho devido à mecanização e à automação das atividades (MANCINI, 2001). O modo de viver foi alterado pela economia do gasto energético no trabalho e nas atividades de vida diária, associada à maior oferta de alimentos. Por essas razões, a obesidade vem sendo denominada "doença da civilização" ou "síndrome do Novo Mundo". (MANCINI, 2001; TAVARES, NUNES e SANTOS, 2010).

A obesidade está associada com uma grande quantidade de doenças crônicas como: i) Doenças cardiovasculares que são a causa de um terço das mortes no Brasil (Rodrigues, 2008). ii) Diabetes Mellitus que corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemias resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambas (SILVA, 2007). iii) A hipertensão arterial que é uma doença crônica que se caracteriza pelo aumento dos valores de pressão sistólica e/ou diastólica (JESUS, 2009) entre outras.

## 2.4 Obesidade e microbiota intestinal

Os microrganismos intestinais possuem a capacidade de degradar carboidratos não digeríveis pelas enzimas do hospedeiro, fornecendo calorias “extras” (SONNENBURG et al., 2005; FLINT et al., 2008). Harley e Karp (2012) propõem vários mecanismos biológicos para definir o papel da microbiota no desenvolvimento da obesidade, tais como: (i) o aumento da capacidade de extrair energia dos alimentos; (ii) alteração direta dos mecanismos energéticos do hospedeiro (armazenamento e uso de energia) através de metabólitos microbianos; (iii) intervenção direta no sistema imune do hospedeiro e; iv) regulação da insulina e colesterol (CANI, 2013).

Diferentes estudos têm mostrado que o desenvolvimento da obesidade está relacionado a mudanças na abundância relativa de dois filos dominantes no intestino, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Os indivíduos eutróficos possuem uma população predominante de *Bacteroidetes*, enquanto indivíduos obesos possuem maior proporção de *Firmicutes* (LEY et al., 2006). Os microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes* possuem enzimas que degradam polissacarídeos que não são digeridos por humanos, e essa energia adicional contribui para a obesidade no hospedeiro (DAS, 2010). Assim, indivíduos com uma comunidade microbiana mais eficiente na extração de energia ou com capacidade de promover a adiposidade podem estar predispostos à obesidade. Esta hipótese foi confirmada por diversos estudos, onde camundongos germ free, a princípio mais resistentes à obesidade, quando transplantados com bactérias intestinais, sem aumento na quantidade de alimentos ingeridos, apresentaram adiposidade aumentada, sugerindo que a colonização bacteriana induz o aumento da lipogênese hepática e aumento no armazenamento de gordura pelos adipócitos (BACKHED et al., 2007; HARLEY e KARP, 2012;

REINHARDT). Além disso, alterações na extração de energia pela microbiota intestinal já foram descritas por Shin, Whon e Bae (2015) com um incremento no filo *Proteobacteria*.

O sistema imunológico é responsável por controlar e regular a relação entre o hospedeiro, a mucosa intestinal e sua população bacteriana residente, e quando há o desequilíbrio, pode resultar em um estado de inflamação baixo grau, característico da obesidade. Estudos têm mostrado que a microbiota intestinal pode provocar este estado inflamatório através da atividade do lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas (MOREIRA et al., 2012) relacionado principalmente ao consumo de gorduras saturadas (LAM et al., 2015). Além disso, o estado de obesidade está relacionado com um aumento de leptina circulante associado ao decréscimo nos níveis de grelina e adipocitocina, estão correlacionados com a manutenção dessa inflamação (MANCO et al., 2007; SMITH et al., 2007; VALERA MORA, 2007; ZHANG et al., 2009).

Devido a esta inflamação crônica de baixo grau, indivíduos obesos possuem maiores níveis de citocinas inflamatórias circulantes. O tecido adiposo dos obesos se torna um sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos (MΦ) do tipo M1, que secretam grandes quantidades de citocinas inflamatórias e quimiocinas que, por sua vez, atraem um maior número de células, aumentando assim os níveis destas moléculas, que contribuem ativamente para a inflamação sistêmica nestes indivíduos (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007)

Cani et al. (2007) demonstraram que camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram endotoxemia metabólica, que corresponde ao aumento de LPS no plasma. Entretanto, foi 10-50 vezes menor do que os níveis encontrados em um choque séptico. A relevância do complexo CD14/TLR4 no processo inflamatório

foi confirmada quando camundongos CD14KO (CANI et al., 2007) e TLR4KO foram protegidos contra a obesidade e doenças metabólicas (SHI et al., 2006). Este LPS endógeno é liberado no intestino após a morte de bactérias Gram-negativas e seu acesso à circulação ocorre principalmente por duas vias: ou através de difusão direta, devido ao aumento da permeabilidade intestinal, uma vez que o aumento na ingestão de gordura saturada e carboidratos simples podem inibir a produção de proteínas de ligação intestinal (MOREIRA et al., 2012; LAM et al., 2015) ou por absorção e incorporação do LPS na estrutura dos quilomicrons (VREUGDENHIL et al., 2003).

## **2.4 Metabólitos e Xenobióticos no Intestino**

Os xenobióticos são definidos como substâncias químicas estranhas ao hospedeiro que entram no corpo através da pele, ingestão ou inalação, não sendo considerados como nutrientes (DORRESTEIN, MAZMANIAN e KNIGHT, 2014). De acordo com Apajalathi, (2005) são classificados em: (i) químicos naturais presentes na dieta; (ii) poluentes do ar e da água, constituídos por substâncias químicas inorgânicas e orgânicas complexas e; (iii) drogas e produtos químicos agrícolas, como pesticidas e fertilizantes, aditivos alimentares, metais pesados, plastificantes, produtos químicos domésticos e industriais. A principal via de exposição à xenobióticos é a oral, pela ingestão de agentes terapêuticos e exposição não intencional à poluentes ambientais presentes nos alimentos e água. Assim, os xenobióticos presentes em fontes alimentícias representam uma fonte significativa de químicos com capacidade de influenciar a microbiota intestinal, causando disbiose (POSSEMIERS et al., 2009).

O metabolismo é o processo pelo qual esses metabólitos são processados. Os xenobióticos administrados por via oral são metabolizados por enzimas da microbiota

intestinal, e esse processo depende da composição da microbiota intestinal e da quantidade do xenobiótico que alcança o cólon, onde podem ser transformados em metabólitos ativos, inativos ou tóxicos (SWANSON, 2015; KIM, 2015).

Por exemplo, o arsênico é um dos xenobióticos mais estudados, é já foi mostrado que pode causar alterações não só na composição da microbiota, mas no microbioma e nos metabólitos presentes no intestino, o que pode afetar diretamente o hospedeiro (LU et al., 2014). Maurice, Haiser e Turnbaugh (2012) observaram a influência de diferentes xenobióticos, entre eles etanol, ácidos, e drogas antimicrobianas no comportamento microbiano intestinal, e concluíram que os antibióticos apresentaram o maior efeito na microbiota intestinal, induzindo alteração nos padrões regulares de transcrição, tradução, biosíntese de vitaminas e transporte de fosfatos; já os outros xenobióticos foram capazes de induzir alterações nas funções microbianas relacionadas ao transporte transmembrana, metabolismo (via pentose-fosfato) e mecanismos catabólicos relacionados à biodegradação dessas substâncias.

Além disso, estudos realizados por Kohanski (2007) mostraram que os xenobióticos podem induzir estresse metabólico, sugerindo que a exposição a esses agentes pode ser um fator de pressão seletiva, e é possível que as respostas expressadas pelo microbioma na presença de xenobióticos estejam relacionadas com respostas a outros alvos naturais. A microbiota intestinal produz uma grande quantidade de metabólitos, como ácidos graxos de cadeia curta, exotoxinas e enzimas, proteínas relacionadas ao *quorum sensing*, metabólitos secundários e outros que ainda não foram caracterizados, mas que tem capacidade de afetar o microambiente intestinal (VOGT, DIAZ e FINLAY, 2015), e sua síntese depende de uma comunicação cruzada entre o hospedeiro, microrganismos e xenobióticos

(DORRESTEIN, MAZMANIAN e KNIGHT, 2014). Esses produtos metabólicos podem ser tóxicos. Por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta podem inibir a colonização de bactérias patogênicas, e, além disso, altas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta e pH externo baixo promovem o acúmulo destes ácidos no citoplasma bacteriano, dissipando a força próton-motiva envolvida na síntese de ATP e mobilidade dos microrganismos (VOGT, DIAZ e FINLAY, 2015).

Diferentes alimentos também podem ter produtos finais tóxicos, como é o caso das proteínas, que no final do seu processo metabólico (putrefação) gera substâncias potencialmente tóxicas, como amônia, aminas, fenóis e tióis (GUARNER e MAGALEGADA, 2003). No caso da amônia, concentrações baixas afetam a morfologia e metabolismo das células intestinais, além da síntese de DNA. Outro derivado do metabolismo da carne, o fecapentano, induz mutações, aberrações nos cromossomos, mudanças nas cromátides e reduz o tempo de vida das células (HUGHES e ROWLAND, 2000). Outros fatores relacionados com o estilo de vida como o estresse, podem alterar a quantidade de bactérias potencialmente benéficas, como as do gênero *Lactobacillus* (GUR e BAILEY, 2016).

No caso da obesidade, estudos em camundongos eutróficos e com excesso de peso mostraram mudanças nos padrões metabólicos. Níveis aumentados de ácido oxolítico, oxocolênico e colandienóico foram observados exclusivamente em camundongos com obesidade, o que permite sugerir a correlação entre a dieta, a microbiota e os metabólitos presentes no intestino (WALKER et al., 2014). Apesar disso, sabe-se pouco sobre todas as funções que esses metabólitos realizam no ambiente intestinal, e quais são as consequências dessas alterações na microbiota intestinal.

## 2.5 Justificativa

Do exposto, dando sequência à linha de pesquisa “Epidemiologia da resistência e resposta bacteriana aos antimicrobianos”, do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF e considerando-se:

- A importância da obesidade nos dias de hoje, considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde;
- Os estudos que relacionam a obesidade com a disbiose e seu impacto na microbiota intestinal, bem como fatores associados que podem contribuir para este estado, como o estilo de vida, alimentação, exposição aos antimicrobianos e outros xenobióticos;
- A importância do fenômeno da resistência às drogas antimicrobianas e a necessidade de estudos regionais sobre sua epidemiologia para proposição de medidas de prevenção e controle;
- A carência de informações sobre os impactos da obesidade na seleção ou persistência de marcadores genéticos relacionados à resistência bacteriana às drogas no ecossistema intestinal;

A investigação da influência do comportamento e da fisiologia de indivíduos com sobrepeso e obesos no fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos, torna-se altamente relevante. A literatura atual é carente de informação científica,

sobretudo, considerando-se o ecossistema intestinal nestes indivíduos de fisiologia alterada, como reservatório de genes de resistência relacionados à drogas antimicrobianas de uso clínico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a ocorrência de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas do resistoma clínico bacteriano em espécimes fecais obtidos de indivíduos categorizados como obesos, com sobrepeso e eutróficos, residentes em Juiz de Fora, MG, e a correlação da sua ocorrência com grupos bacterianos representativos de espécies que comumente albergam esses marcadores no seu genoma.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

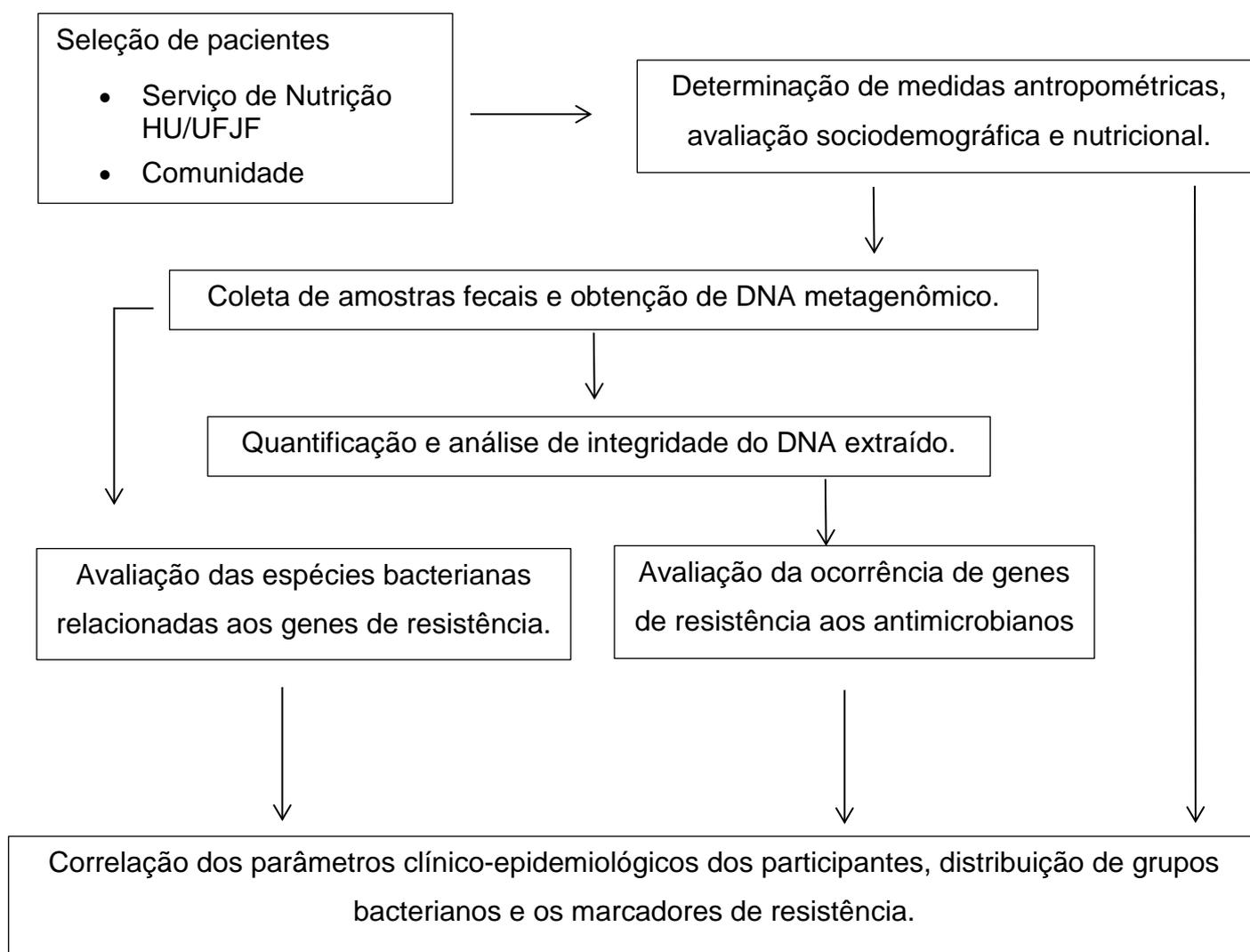
- Recrutar indivíduos, realizar medidas antropométricas, avaliação sócio - demográfica e avaliação nutricional para caracterização de participantes eutróficos, com sobrepeso e obesos na cidade de Juiz de Fora, MG;
- Obter DNA representativo do metagenoma intestinal a partir de espécimes fecais dos indivíduos participantes categorizados em eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Avaliar a presença de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas do resistoma clínico nos metagenomas obtidos, por PCR;

- Avaliar a distribuição de grupos bacterianos associados aos genes de resistência pesquisados, nos metagenomas obtidos, por FISH;
- Correlacionar os parâmetros clínico-epidemiológicos dos participantes, a distribuição de grupos bacterianos e os marcadores de resistência a drogas observados nos metagenomas obtidos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

A estratégia experimental é descrita no fluxograma 1.



**Fluxograma 1:** Representação esquemática da estratégia experimental para o estudo de ocorrência de genes de resistência bacteriana às drogas no metagenoma intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos e sua correlação com ocorrência de grupos bacterianos de interesse e características antropométricas, sociodemográfica e nutricional dos indivíduos.

#### **4.2 Seleção de pacientes, coleta e preparo de amostras.**

Este estudo é do tipo transversal, prospectivo, descritivo e observacional, realizado com indivíduos adultos, selecionados na comunidade e no ambulatório do serviço de nutrição do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 60 anos e Índice de Massa Corporal (IMC) a partir de  $18,5 \text{ kg/m}^2$ . Os critérios de exclusão foram: doenças intestinais, uso de antibióticos no último mês e diagnóstico confirmado de diabetes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (Anexo 1). Todos os voluntários foram informados a respeito dos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (Anexo 2).

Para avaliação antropométrica, foram aferidos o peso, a estatura, as circunferências da cintura (CC), abdominal (CA) e quadril (CQ). O peso dos participantes foi aferido em balança digital com o indivíduo em posição central, ereto, descalço, com os pés juntos, e usando o mínimo de roupa possível. A altura foi verificada utilizando-se um estadiômetro vertical fixo à balança, também descalço e ereto, com calcanhares unidos, com a cabeça livre de adereços e olhando para o horizonte. O IMC foi calculado a partir da relação peso (kg)/altura ( $\text{m}^2$ ) e avaliado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde (1998).

As aferições das circunferências foram feitas usando fita métrica flexível e inextensível de 150cm de comprimento, estando no plano horizontal e no mesmo nível em todas as partes, com o indivíduo em pé, ereto, braços estendidos ao longo do corpo e sem comprimir os tecidos. A circunferência da cintura foi aferida a 2 dedos acima da cicatriz umbilical e com a roupa afastada, sendo analisada segundo os

pontos de OMS (1998), onde  $CC \geq 94$  cm e  $\geq 80$ cm indica risco cardiovascular para homens e mulheres respectivamente. Já circunferencia abdominal foi medida na altura da cicatriz umbilical também com a roupa afastada e a circunferencia do quadril foi aferida na área de maior proeminência da região glútea. A relação cintura quadril é obtida pela divisão da circunferência da cintura pela circunferência do quadril, sendo usado para análise com valores de corte considerados pela OMS (1995), onde RCQ  $>1$  para homens e  $>0,85$  para mulheres são indicativos de obesidade andróide e risco aumentado de doenças relacionadas com a obesidade. Para diminuir o viés neste estudo, as medidas foram tomadas sempre pelo mesmo profissional de nutrição, usando a mesma cinta métrica e balança. Assim, com base nesses critérios, 72 indivíduos foram selecionados e divididos em 3 grupos: eutróficos (IMC = 18.5 – 25), com sobrepeso (IMC= 25 – 30) e obesos (IMC  $> 30$ ).

Para estimar a ingestão habitual dos participantes, aplicou-se um questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA) adaptado. Para cada item do QQFA, validado por Ribeiro e Cardoso (2002), os voluntários informaram a frequência média de consumo habitual de alimentos (diária, semanal ou mensal) relativa aos últimos seis meses e o tamanho da porção ingerida. Para ajudar os participantes na estimativa das porções, usou-se o álbum fotográfico elaborado por Sales, Costa e Silva (2004), que contém imagens dos alimentos questionados e diferentes tamanhos das porções ingeridas.

Amostras fecais dos participantes foram coletadas em domicílio no início da manhã, por demanda espontânea pelos participantes, em recipientes coletores universais esterilizados e fornecidos pelos pesquisadores. Os recipientes com as amostras fecais foram prontamente enviadas para o Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF, onde foram aliquotadas.

Para extração de DNA metagenômico, foram pesados 200mg de fezes, e armazenados em freezer -20°C; para análise dos grupos bacterianos de interesse, por FISH, 150mg de fezes foram pesados e fixados em paraformaldeído 2%.

#### **4.3 Extração de DNA das amostras fecais.**

O DNA total foi extraído usando o kit comercial *QIAamp™ DNA Stool Mini Kit* e a plataforma automatizada *Qiacube* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e algumas modificações para aumento no rendimento do DNA metagenômico. Inicialmente, três pérolas de vidro foram adicionadas por amostra na etapa de lise celular e homogeneizadas em vórtex durante 2 minutos. Em seguida as amostras foram incubadas a 95°C, por 15 min, e subsequentemente agitadas em vórtex, vigorosamente, por mais 2 minutos adicionais. Após esta etapa, 300 mL de tampão InhibiTex (fornecido no kit) foram adicionados às suspensões fecais, seguido de homogeneização, incubação e centrifugação. Posteriormente, o procedimento de obtenção dos extratos de DNA foram continuados na plataforma automatizada *Qiacube*, de acordo com o proGrama específico para o *QIAamp™ DNA Stool Mini Kit*. O DNA representativo do metagenoma intestinal foi eluído em volume de 200µL e mantido em freezer a -70°C para estudos posteriores.

A concentração e a pureza do DNA metagenômico foram determinadas por fluorimetria usando-se o fluorímetro Qubit™ 2.0®, com o kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* (Life Technologies, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl-Borato-EDTA). O gel foi corado com brometo de etídio e

analisado em transiluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). O DNA extraído foi alíquotado e armazenado em freezer a -70°C.

### 4.3 Detecção dos genes de resistência

Os marcadores de resistência *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(E)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(O)*, *aacA-AphD*, *ampC*, *blaZ*, *blaCTX-M*, *ereA*, *ereB*, *linA*, *mecA*, *mphA*, *mrsA*, *mef*, *mrsB*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vga*, *vgb*, *bla-KPC*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *bla<sub>OXA23</sub>*, *bla<sub>OXA51</sub>*, *bla<sub>OXA58</sub>*, *bla<sub>OXA24</sub>*, *bla<sub>OXA1</sub>*, *bla<sub>OXA10</sub>*, *bla<sub>OXA2</sub>*, *bla<sub>OXA143</sub>*, *bla<sub>SPM-1</sub>*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *nim1*, *nim2*, *nim3*, *nim4*, *qnrS*, *qnrB*, *cepA*, *cfxA*, *cfxA<sub>2</sub>*, *cfiA*, *qnrB*, *qnrS*, representativos do resistoma clínico fecal, foram pesquisados a partir do DNA metagenômico extraído das amostras fecais por PCR convencional, utilizando oligoiniciadores específicos e condições de amplificação já descritas na literatura (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1µL de DNA (~20ng/µL), o volume do primer foi de acordo com a referência usada e o volume foi completado com água. Foi realizado em termociclador automatizado (Biometra T1 Thermal Cycler, Gttingen, Alemanha). Os amplicons foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido) após eletroforese em gel de agarose 1.5% e corados com brometo de etídio. Foi utilizado o padrão de peso molecular 100bp DNA ladder (Promega Corporation, Madison, WI, USA). As condições de amplificação, bem como as concentrações de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores seguiram os protocolos das referências. O controle negativo foi realizado a partir de reações sem DNA molde. Como controle positivo,

foram utilizadas amostras da coleção positivas para os genes: *bla<sub>Z</sub>*, *tet(K)*, *tet(M)*, *mecA*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *ereB*, *mrsa*, *bla<sub>TEM</sub>*, *aacA-aphD*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *bla<sub>OXA23</sub>*, *bla<sub>OXA51</sub>*, *bla<sub>OXA143</sub>*, *bla<sub>OXA10</sub>*, *bla<sub>OXA2</sub>*, *bla<sub>SPM-1</sub>*. Para os demais genes pesquisados foram realizados ensaios de sequenciamento de amplicons selecionados numa amostragem de 10% das reações específicas de cada um dos marcadores. Para as reações do sequenciamento foram utilizados os produtos de PCR de cada gene estudado em duas réplicas. As reações foram processadas em equipamento ABI 3730 DNA analyser (Applied Biosystems/USA).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo, tamanhos dos fragmentos esperados e referências.

<b>Gene alvo</b>	<b>Antimicrobiano</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Amplicon (bp)</b>	<b>Referência</b>
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Beta-lactâmico	ATG TGC AGY ACC AGT AAA G GGT CAC CAG AAG GAG C	562	Jones et al., 2009
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Beta-lactâmico	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	892	Jones et al., 2009
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Beta-lactâmico	CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC	982	Jones et al., 2009
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Beta-lactâmico	GTG CGC GGA ACC CCT ATT TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	968	Jones et al., 2009
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Beta-lactâmico	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	Beta-lactâmico	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	Beta-lactâmico	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-143</sub>	Beta-lactâmico	TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC	149	Higgins et al., 2010
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	Beta-lactâmico	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	Beta-lactâmico	TCT TTC GAG TAC GGC ATT AGC CCA ATG ATG CCC TCA CTT TCC	760	Naas et al., 2000
<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Beta-lactâmico	GCC AAA GGC ACG ATA GTT G GCG TCC GAG TTG ACT GCC GG	701	De Champs et al., 2002

Tabela 1. Continuação...

<i>blaZ</i>	Beta-lactâmico	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	Martineu et al., 2000.
<i>cfxA/cfxA2</i>	Beta-lactâmico	CGT AGT TTT GAG TAT AGC TTT GAT GTT GCC TAT ATA TGT C	802	Morin, Madinier e Fosse, 2003.
<i>ampC</i>	Beta-lactâmico	ATA ACC ACC CAG TCA CGC CAG TAG CGA GAC TGC GCA	630	Odeh et al., 2002
<i>blaSPM-1</i>	Beta-lactâmico	CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	649	Gales et al., 2003
<i>cfiA</i>	Beta-lactâmico	TCC ATG CTT TTC CCT GTC GCA GTT AT GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC	683	Sóki et al., 2004
<i>tet(A)</i>	Tetraciclina	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	210	Ng et al., 2001
<i>tet(B)</i>	Tetraciclina	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	659	Ng et al., 2001
<i>tet(E)</i>	Tetraciclina	AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG	278	Ng et al., 2001
<i>tet(K)</i>	Tetraciclina	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	360	Strommenger et al., 2003
<i>tet(L)</i>	Tetraciclina	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	267	Ng et al., 2001
<i>tet(M)</i>	Tetraciclina	AGT GGA GCG ATT ACA GAA CAT ATG TCC TGG GGT GTC TA	158	Strommenger et al., 2003

Tabela 1. Continuação...

<i>tet(O)</i>	Tetraciclina	AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC CGG CGG GGT TGG CAA ATA	1723	Trzcinski et al., 2000
<i>tet(Q)</i>	Tetraciclina	TTA TAC TTC CTC CGG CAT CG ATC GGT TCG AGA ATG TCC AC	904	Ng et al., 2001
<i>mrsA</i>	Meticilina	TCC AAT CAT AGC ACA AAA TC AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT	163	Chaieb et al., 2007
<i>mecA</i>	Meticilina	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	Zhang et al., 2004
<i>mef</i>	Meticilina	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC TTC TTC TGG TAC AAA AGT GG	348	Chaieb et al., 2007
<i>ereA</i>	Eritromicina	AAC ACC CTG AAC CCA AGG GAC G CTT CAC ATC CGG ATT CGC TCG A	420	Sutcliffe et al., 1996
<i>ereB</i>	Eritromicina	AGA AAT GGA GGT TCA TAC TTA CCA CAT ATA AAT CAT CAC CAC CAA TGG CA	546	Sutcliffe et al., 1996
<i>mphA</i>	Eritromicina	AAC TGT ACG CAC TTG C GGT ACT CTT CGT TAC C	837	Sutcliffe et al., 1996
<i>ermA</i>	MLS	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	190	Strommenger et al., 2003
<i>ermB</i>	MLS	CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATG AAA GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	142	Martineau et al., 2003
<i>ermC</i>	MLS	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG	299	Strommenger et al., 2003

Tabela 1. Continuação...

<i>qnrB</i>	Quinolona	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG ATG AGC AAC GAT GCC TGG TA	476	Kim et al., 2009
<i>qnrS</i>	Quinolona	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	428	Kim et al., 2009
<i>su1</i>	Sulfonamida	ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT CTG A CTA GGC ATG ATC TAA CCC TCG GTC T	815	Grape, Sundstrom e Kronvall, 2003.
<i>su2</i>	Sulfonamida	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT	396	Hindi, Shubbar e Addos, 2013.
<i>su3</i>	Sulfonamida	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA	396	Grape, Sundstrom e Kronvall, 2003.
<i>nim1</i>	Metronidazole	ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC	458	Trinh e Reysset, 1996.
<i>nim2</i>	Metronidazole	ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC	458	Trinh e Reysset, 1996.
<i>nim3</i>	Metronidazole	ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC	458	Trinh e Reysset, 1996.
<i>nim4</i>	Metronidazole	ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC	458	Trinh e Reysset, 1996.
<i>aacA - aphD</i>	Aminoglicosídeo	TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA	227	Strommenger et al., 2003
<i>vatA</i>	MLS*	TGG TCC CGG AAC AAC ATT TAT TCC ACC GAC AAT AGA ATA GGG	268	Strommenger et al., 2003

\*Macrólido, Lincosamida e estreptoGramina

Tabela 1. Continuação...

<i>vatB</i>	MLS	GCT GCG AAT TCA GTT GTT ACA CTG ACC AAT CCC ACC ATT TTA	136	Strommenger et al., 2003
<i>vatC</i>	MLS	AAG GCC CCA ATC CAG AAG AA TCA ACG TTC TTT GTC ACA ACC	467	Strommenger et al., 2003
<i>vga</i>	MLS	CCG AAC TGC TAT TAG CAG A AAG TTC GTT TCT CTT TTC GA	470	Lina et al., 1999
<i>vgb</i>	MLS	ACT AAC CAA GAT ACA CAG GAC C TTA TTG CTT GTC AGC CTT CC	734	Lina et al., 1999
<i>linA</i>	MLS	GGT GGC TGG GGG GTA GAT GT GCT TCT TTT GAA ATA CAT GG	323	Sutcliffe et al., 1996
<i>mrsB</i>	MLS	TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC AAG TTTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT	334	Lina et al., 1999
<i>cepA</i>	MLS	TTT CTG CTA TGT CCT GCC C ATC TTT CAC GAA GAC GGC	743	Nakano et al., 2011
<i>mexB</i>	*	GTG TTC GGC TCG CAG TAC TC AAC CGT CGG GAT TGA CCT TG	244	Yoneda et al., 2005
<i>mexD</i>	*	CGA GCG CTA TTC GCT GC CGA GCG CTA TTC GCT GC	165	Xavier et al., 2010
<i>mexF</i>	*	GGC AGT TGC ACG TCG A CGC CTG GTC ACC GAG GAA GAG T	255	El Amin et al., 2005
<i>mexY</i>	*	TAG TCC ATG GCT TGC GGG AAG C CCG CTA CAA CGG CTA TCC CT	250	Yoneda et al., 2005

\* Bombas de efluxo que conferem resistência cruzada a diferentes drogas antimicrobianas

#### **4.4 Avaliação quantitativa e qualitativa das espécies bacterianas por hibridização fluorescente *in situ* (FISH).**

A partir das amostras fixadas previamente com paraformaldeído 2%, foram adicionados 1100µL de TWEEN 0,001%, e incubadas a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente, as amostras foram sonicadas (Sonicador Vibra Cell VCX 130PB), imersas em gelo, a uma amplitude de 90% por 3 vezes com pulsos de duração de 60 segundos e vórtex de 60 segundos entre cada pulso. Após, foi realizada centrifugação por 5 min, o sobrenadante foi coletado em tubo do tipo Falcon de 50 mL, e lavados duas vezes com 5 mL de água destilada, e novamente centrifugados por 5 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro de policarbonato de 25mm de diâmetro, 0.2 µm de poro (Whatman GE Healthcare, Maidstone, Reino Unido).

A câmara de hibridização foi preparada com um lenço de papel no fundo de um tubo tipo Falcon de 50mL e saturado com 1mL de solução de hibridização. Após, 20µL de cada sonda foi colocado em uma lâmina coberta com parafilme junto com o filtro e mais 20µL de sonda foram colocados no papel de filtro. A lâmina foi colocada na câmara de hibridização e incubada a 42°C, por 16 h. Para a lavagem dos filtros após a hibridização, foi adicionado 1mL da solução de lavagem correspondente a concentração da sonda, e os filtros foram colocados a 48°C durante 15 min e corados durante 3 min com 30µL de DAPI e lavados 3 vezes com etanol 80%.

Os filtros corados com DAPI foram secados e colocados em uma nova lâmina, com uma gota de glicerol e lamínula por cima. A presença de bactérias no filtro foi visualizada em microscópio de epifluorescência Olympus IX-71 com o filtro UV para

o DAPI e filtro de acrilamida para as sondas. As sequências das sondas utilizadas estão disponíveis na Tabela 2.

**Tabela 2:** Marcadores específicos utilizados para análise da composição da comunidade bacteriana por FISH

Nome	Bactérias	Grupo	Sequência (5' – 3')	Formamida (%)	Referência
Bfra602	Grupo <i>B. fragilis</i>	B. Gram negativos anaerobios	GAG CCG CAA ACT TTC ACA A	30%	Franks et al., 1998.
Bfrag998	<i>Bacteroides fragilis</i>	B. Gram negativos anaerobios	GTT TCC ACA TCA TTC CAC TG	30%	Rigottier-Gois et al., 2003.
ECO1167	<i>Escherichia coli</i>	Bastonetes Gram negativos	GCA TAA GCG TCG CTG CCG	40%	Neef, Amann e Schleifer, 1995.
Enc1259	<i>Enterococcus spp.</i>	Cocos Gram positivos	GAA GTC GCG AGG CTA AGC	35%	Behr et al., 2000.
FUS664	<i>Fusobacterium sp</i>	Gram negativos anaerobios	CTT GTA GTT CCG CYT ACC TC	40%	Gmur et al., 2004.
PINT649	<i>Prevotella intermedia</i>	Gram negativos anaerobios	GCC GCC RCT GAA STC AGG CC	40%	Gmur e Thurnheer, 2002.
PNG675	<i>Prevotella nigrescens</i>	Gram negativos anaerobios	TCC GCC TGC GCT GCG TGT A	40%	Gmur e Thurnheer, 2002.
Pae997	<i>Pseudomonas sp.</i>	Bastonetes Gram negativos	TCT GGA AAG TTC TCA GCA	35%	Amman et al., 1996.
KO218	<i>S. aureus, S. haemolyticus</i>	Cocos Gram positivos	GAA GCA AGC TTC TCG TCC G	20%	Franke, Klammer e Insam, 2005.
Str	<i>Streptococcus spp.</i>	Cocos Gram positivos	CAC TCT CCC CTT CTG CAC	30%	Trebesius et al., 2000.
ACA652	Gênero <i>Acinetobacter</i>	B. Gram negativos	ATC CTC TCC CAT ACT CTA	35%	Wagner et al., 1994.

#### 4.5 Análise estatística

Foi realizado teste *t* de Student, para comparação entre médias, considerando-se valores de  $p \leq 0,05$  para as análises, utilizando-se a calculadora estatística do Social Science Statistics, 2015.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para determinar se houve diferenças significativas na frequência de detecção dos marcadores de resistência, considerando-se valores de  $p \leq 0,05$  para as análises e utilizando-se o programa de análise estatística Biostat 5,0.

Foi estudada a relação entre a densidade dos grupos bacterianos estudados e a frequência de detecção dos marcadores de resistência os quais foram agrupados de acordo com as referências usadas. Posteriormente foi calculada uma razão entre o número absoluto de detecção dos marcadores de cada conjunto e a frequência relativa de cada grupo bacteriano (Quadro 1).

A análise da correlação entre a ocorrência dos marcadores de resistência, e características antropométricas e nutricionais dos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos foi avaliada calculando-se razão de Odds (OR) (BLAND e ALTMAN, 2000). Valor de OR igual a 1 indica que a condição sob estudo é igualmente provável de ocorrer nos dois grupos. OR maior do que 1 indica que a condição tem maior probabilidade de ocorrer no primeiro grupo, e valor de OR menor do que 1 indica que a probabilidade é menor no primeiro grupo do que no segundo.

**Quadro1.** Agrupamento dos marcadores de resistência a drogas antimicrobianas avaliados e os grupos bacterianos relacionados a eles.

<b>Grupo Bacteriano</b>	<b>Marcadores associados</b>
Bastonetes Gram negativos Anaeróbios	<i>cfiA, cepa, cfxA, cfxA<sub>2</sub>, nim1, nim2, nim3, nim4</i>
Bastonetes Gram negativos	<i>bla<sub>OXA2</sub>, qnrB, qnrS, sul1, sul2, mexY, tet(Q), tet(B), ampC, tet(L), tet(A), tet(E), tet(O), bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>TEM</sub>, tet(M), bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>OXA143</sub>, mexY, tet(M), bla<sub>OXA23</sub>, bla<sub>OXA51</sub>, bla<sub>OXA58</sub>, bla<sub>OXA24</sub>, bla<sub>OXA1</sub>, bla<sub>OXA10</sub>, bla<sub>SPM-1</sub>, mexB, mexD, sul3, blaKPC, tet(K), mexF</i>
Cocos Gram positivos	<i>aaca-aphd, mef, ereB, mphA, vgb, blaZ, ereA, vatA, vatB, vatC, mecA, erma, ermB, ermC, mrsB, linA, vga, vgb, vatA, vatB, vatC, mrsA.</i>

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características Sócio-demográficas, antropométricas e nutricionais dos participantes**

Dos 72 indivíduos participantes deste estudo, totalizando 24 indivíduos em cada grupo amostrado (eutróficos, com sobrepeso e obesos), 62.5% pertenciam ao sexo feminino e 37.5% ao masculino, com uma média de idade de 39,61 anos. Os dados de gênero e idade por grupo, além do estado civil, raça, renda mensal e escolaridade dos pacientes, estão apresentados na Tabela 3.

Em relação às características antropométricas, existe um aumento gradual nas medidas de circunferência abdominal, cintura, quadril, relação cintura quadril e IMC de acordo com os grupos estudados. Assim, a menor medida foi a achada no grupo eutrófico, e a maior no grupo obeso, sendo o grupo de transição o grupo com sobrepeso (Tabela 4).

**Tabela 3.** Características sócio-demográficas dos participantes.

<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Eutróficos (n=24)</b>	<b>Sobrepeso (n=24)</b>	<b>Obeso (n= 24)</b>
Idade média (anos; variação)	37,91; ± 12	38,12; ± 13.38	42,79; ± 11.67
Sexo: n (%)			
Masculino	7 (30%)	12 (50%)	9 (37,5%)
Feminino	17 (70%)	12 (50%)	15 (62,5%)
Estado civil: n (%)			
Solteiro	12 (50%)	10 (41,6%)	10 (41,6%)
Casado	11 (45,8%)	13 (54,1%)	13 (54,1%)
Outro	1 (4,1%)	1 (4,1%)	1 (4,1%)
Raça (cor da pele): n (%)			
Branca	16 (66,6%)	15 (62,5%)	12 (47,4%)
Parda	5 (20,8%)	5 (20,8%)	7 (42,1%)
Negra	2 (8,3%)	3 (12,5%)	5 (10,5%)
Indefinido*	1 (4,1%)	1 (4,1%)	0
Renda mensal**: n (%)			
1-3	10 (41,7%)	13 (54,1%)	20 (83,3%)
4-6	2 (8,3%)	8 (33,3%)	0
7-9	3 (12,5%)	1 (4,1%)	2 (8,3%)
10-13	9 (37,5%)	2 (8,3%)	2 (8,3%)
Escolaridade: n (%)			
Fundamental completo	2 (8,3%)	6 (25%)	3 (12,5%)
Fundamental incompleto	4 (16,6%)	7 (29,1%)	3 (12,5%)
Médio completo	4 (16,6%)	7 (29,1%)	7 (29,1%)
Médio incompleto	1 (4,1%)	0	1 (4,1%)
Superior completo	11 (45,8 %)	3 (12,5%)	7 (29,16%)
Superior incompleto	2 (8,3 %)	1 (4,1%)	3 (12,5%)

\* O participante não soube definir;

\*\* Renda mensal em salários mínimos de referência, Brasil em 2015 (R\$788,00).

**Tabela 4.** Características antropométricas dos participantes.

Variáveis analisadas (n; variação; sexo)		Valores de referencia	Eutróficos (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n= 24)
IMC		*	22.82 ± 1,77	29.79 ± 14,05	36,98 ± 6,04
Circunferência abdominal	Homens	Normal ≥ 94cm	82,0 ± 4,9 98,0 ± 3.1	88,6 ± 3,8 97,4 ± 2,0	0 98,6 ± 3,2
	Mulheres	Normal ≥ 80cm	77,0 ± 2,4 83,7 ± 2,0	0 84,5 ± 2,1	0 0
Circunferência cintura	Homens	Normal ≥ 80cm	0 92,4 ± 6,3	0 90,54 ± 5	0 106,5 ± 9,5
	Mulheres	Normal ≥ 90cm	74,27 ± 3,7 0	0 84,44 ± 4,3	0 115,8 ± 18,4
Circunferência quadril	**	**	99,2 ± 4,6	105,4 ± 4,2	114,9 ± 25,0
Relação cintura/quadril	Homens	Normal >1	0.73 ± 0.4 0	0 0.88 ± 0.7	0 1.02 ± 0.2
	Mulheres	Normal >0,85	0.71 ± 0.3 0	0 0.89 ± 0.4	0 1.1 ± 0.8

\*Valores de referência e classificação de acordo com a Organização Mundial de Saúde (1998); \*\* Não há valores de referência. H = Homem; M = Mulher

Em relação à avaliação nutricional, foi determinado o consumo calórico e de macronutrientes dos pacientes (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras). Em relação à ingestão calórica diária, observou-se uma diferença significativa entre a quantidade de calorias médias ingeridas pelos indivíduos dos grupos eutrófico e obeso, sendo o consumo médio de calorias pelos eutróficos 1891.58kcal/dia, enquanto que os obesos relataram ingestão média de 2191.33kcal/dia. O grupo formado pelos indivíduos com sobrepeso apresentou uma ingestão média de calorias de 2018.79kcal/dia caracterizando um grupo de transição semelhante tanto ao grupo eutrófico, quanto ao grupo obeso (Figura 1).

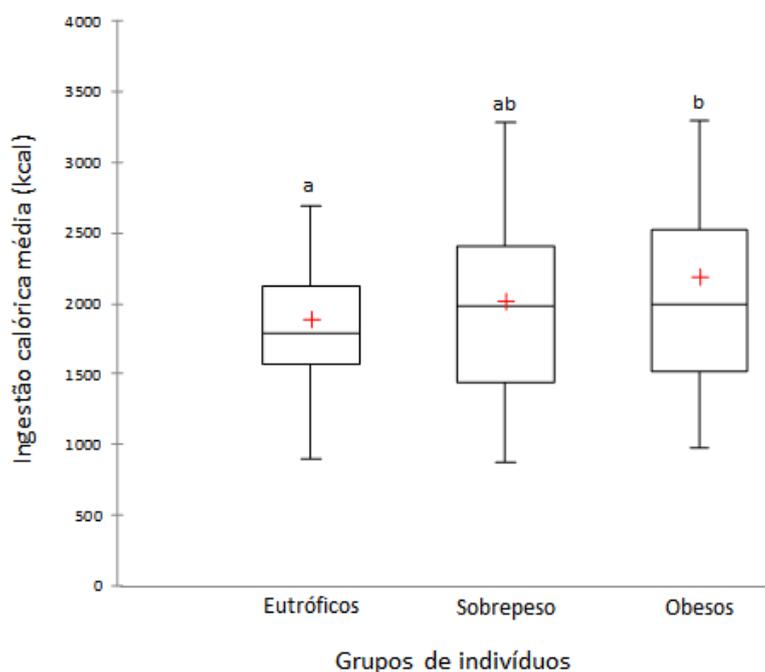


Figura 1. Média da ingestão calórica pelos indivíduos dos grupos em estudo. As letras a e b indicam diferença significativa no consumo calórico entre os grupos ( $p < 0.05$ ).

Em relação à ingestão de carboidratos e fibras totais, os resultados mostraram que existe uma diferença significativa no consumo destes nutrientes entre os grupos de indivíduos eutrófico e obeso, que apresentaram médias de consumo diário de carboidratos de 54 e 57%, e de fibras 23 e 30%, respectivamente. Já considerando-se o grupo de indivíduos com sobrepeso, foi observado um consumo diário destes nutrientes semelhante aos os dois primeiros grupos, na forma de uma transição (carboidratos 55% e fibras 25%) (Figuras 2A e 2D). Para a avaliação do consumo diário de proteínas e lipídios não foi observada diferença significativa entre os indivíduos avaliados (Figura 2B; 2C).

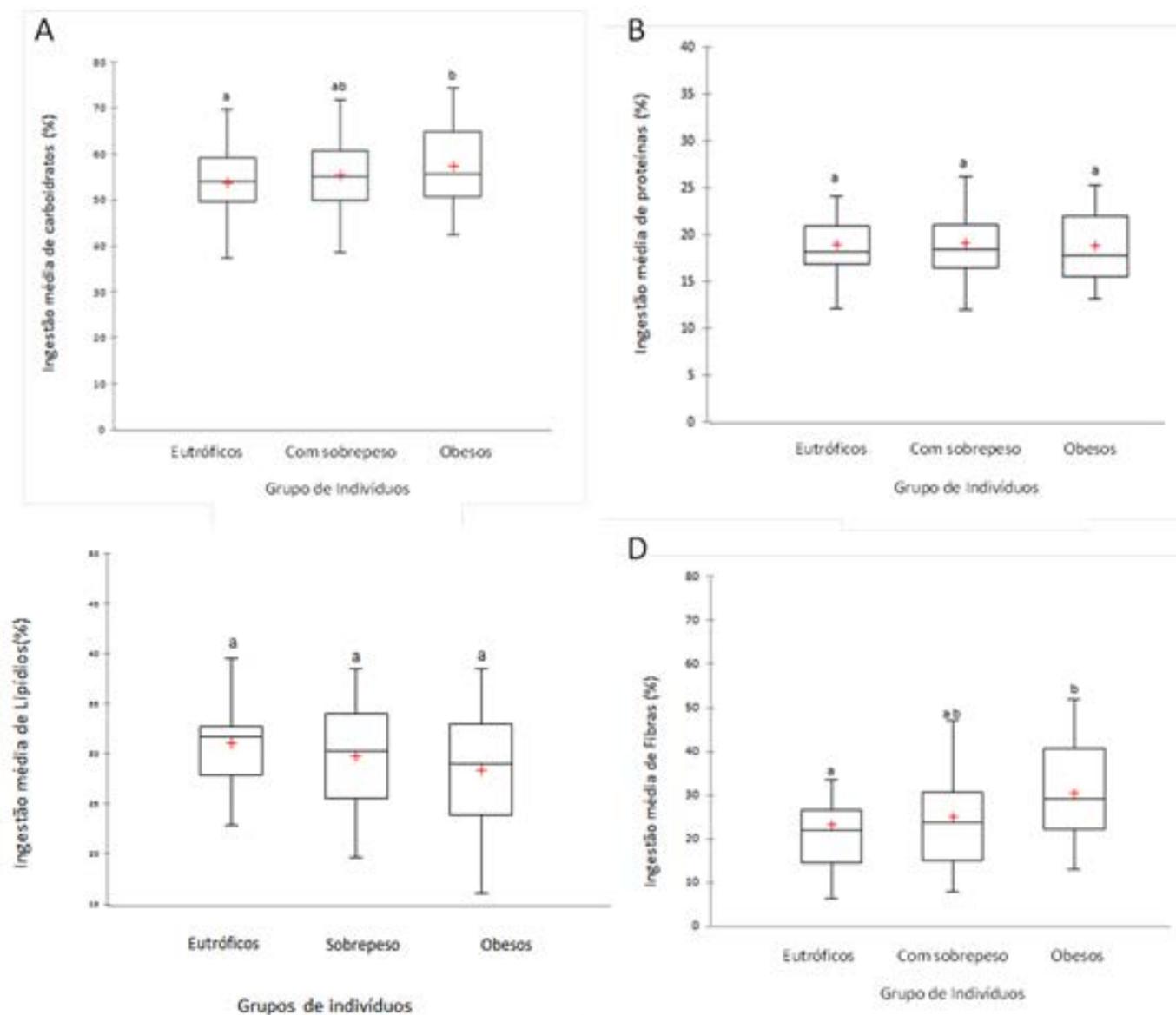


Figura 2. Média da ingestão de grupos de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos em estudo. As letras a, b e c indicam diferença significativa no consumo de diferentes nutrientes entre os grupos ( $p < 0.05$ ). A – ingestão média de carboidratos; B – ingestão média de proteínas; C – ingestão média de lipídios; D – ingestão média de fibras.

Os pacientes relataram não ter usado antibióticos no último mês, porém, foi identificado o uso de diferentes medicamentos, suplementos nutricionais e adoçantes artificiais (edulcorantes). Em geral, os indivíduos do grupo obeso relataram uso de antidepressivos, antiácidos, anti-inflamatórios, diuréticos, barbitúricos, e outros medicamentos sem descrição dos princípios ativos ou nomes comerciais. Os indivíduos do grupo com sobrepeso relataram uso de antidepressivos, anti-inflamatórios, tamoxifeno, anticoncepcionais e suplementos nutricionais. Com uso menor de medicamentos, os indivíduos eutróficos relataram apenas o uso de antidepressivo e suplementos nutricionais como: whey protein, sulfato de glicosamina e condroitina. (Figura 3).

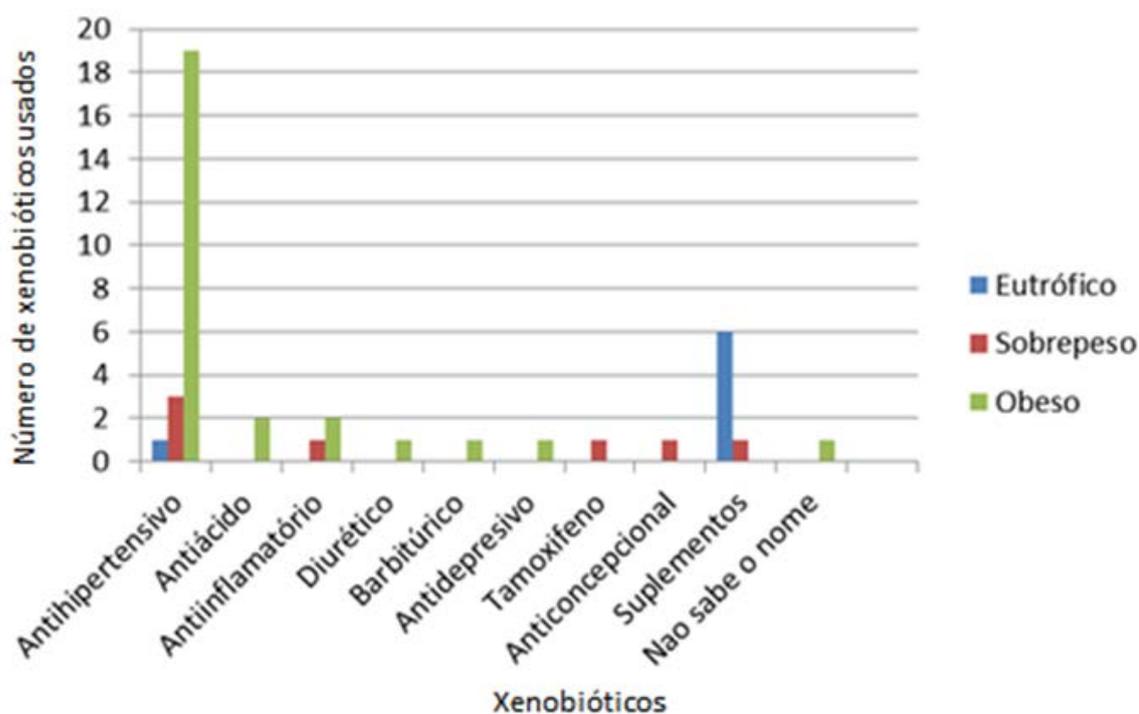


Figura 3. Distribuição de medicamentos e suplementos alimentares em uso pelos indivíduos dos grupos em estudo, segundo declaração durante o inquérito nutricional.

Além dos medicamentos e dos suplementos nutricionais, foi investigado, ainda, o uso de outros xenobióticos, como os adoçantes artificiais (edulcorantes), os quais foram classificados de acordo com sua composição. Todos os grupos de indivíduos relataram fazer uso dessas substâncias, embora seu uso, no geral, foi menos relatado entre os eutróficos (Figura 4).

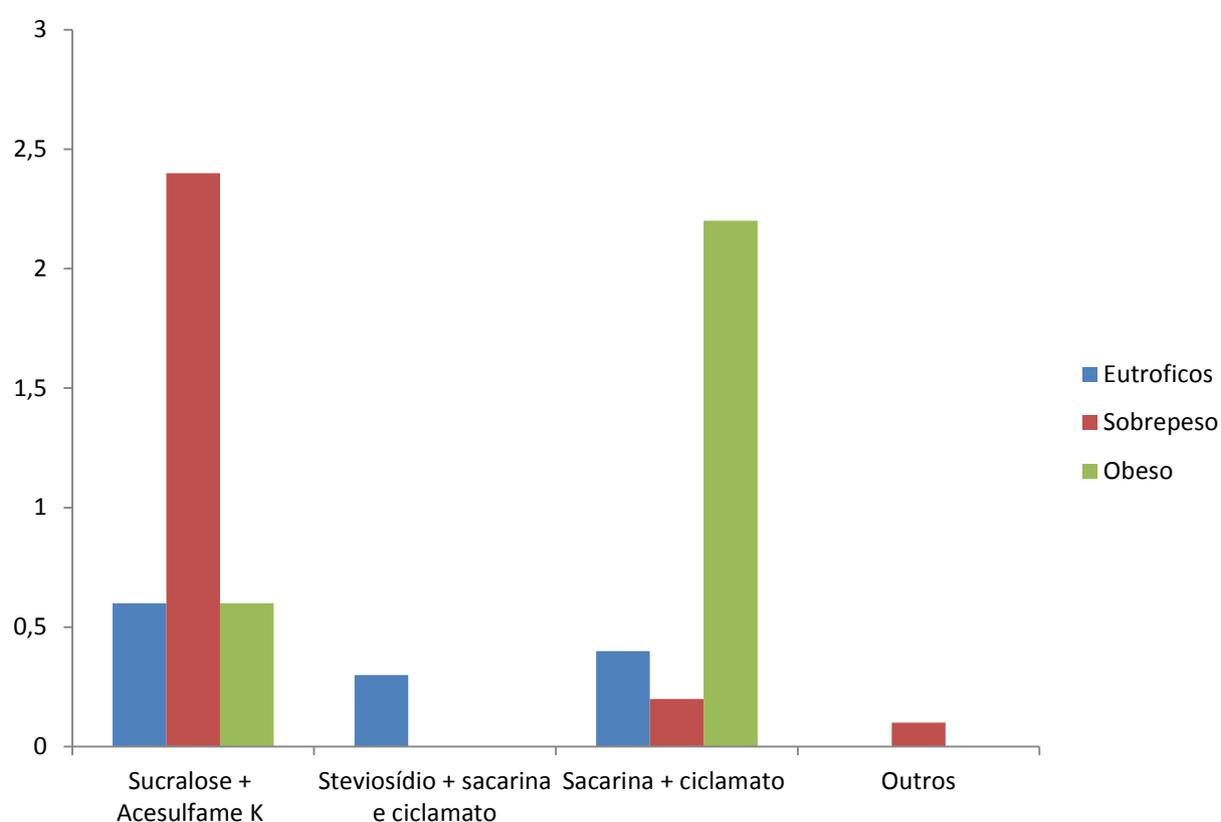


Figura 4. Distribuição de edulcorantes em uso pelos indivíduos dos grupos em estudo, segundo declaração durante o inquérito nutricional.

## 5.2 Detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos

O resistoma clínico referido neste estudo foi composto de 59 marcadores genéticos de resistência, representativos de antimicrobianos de uso corrente na medicina humana e animal no Brasil. Esses marcadores são tanto de origem cromossômica, quanto de origem extracromossômica. Desse total, 27 tipos de marcadores foram observados no metagenoma fecal dos indivíduos amostrados, sendo que entre os indivíduos obesos foram detectados maior número desses marcadores (Figuras 5 e 6).

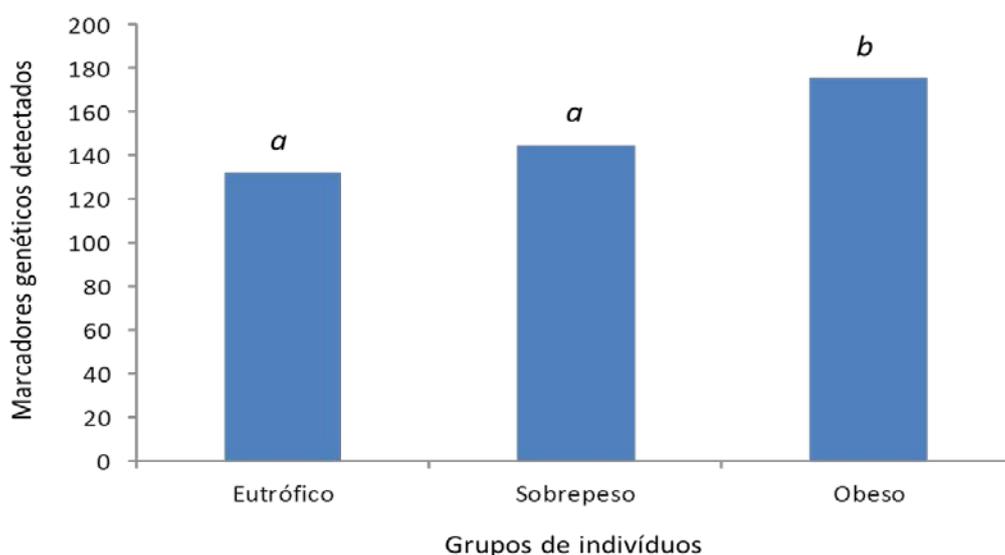


Figura 5. Avaliação comparativa da quantidade de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas amplificados a partir metagenoma fecal, representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos. As letras *a* e *b* indicam diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

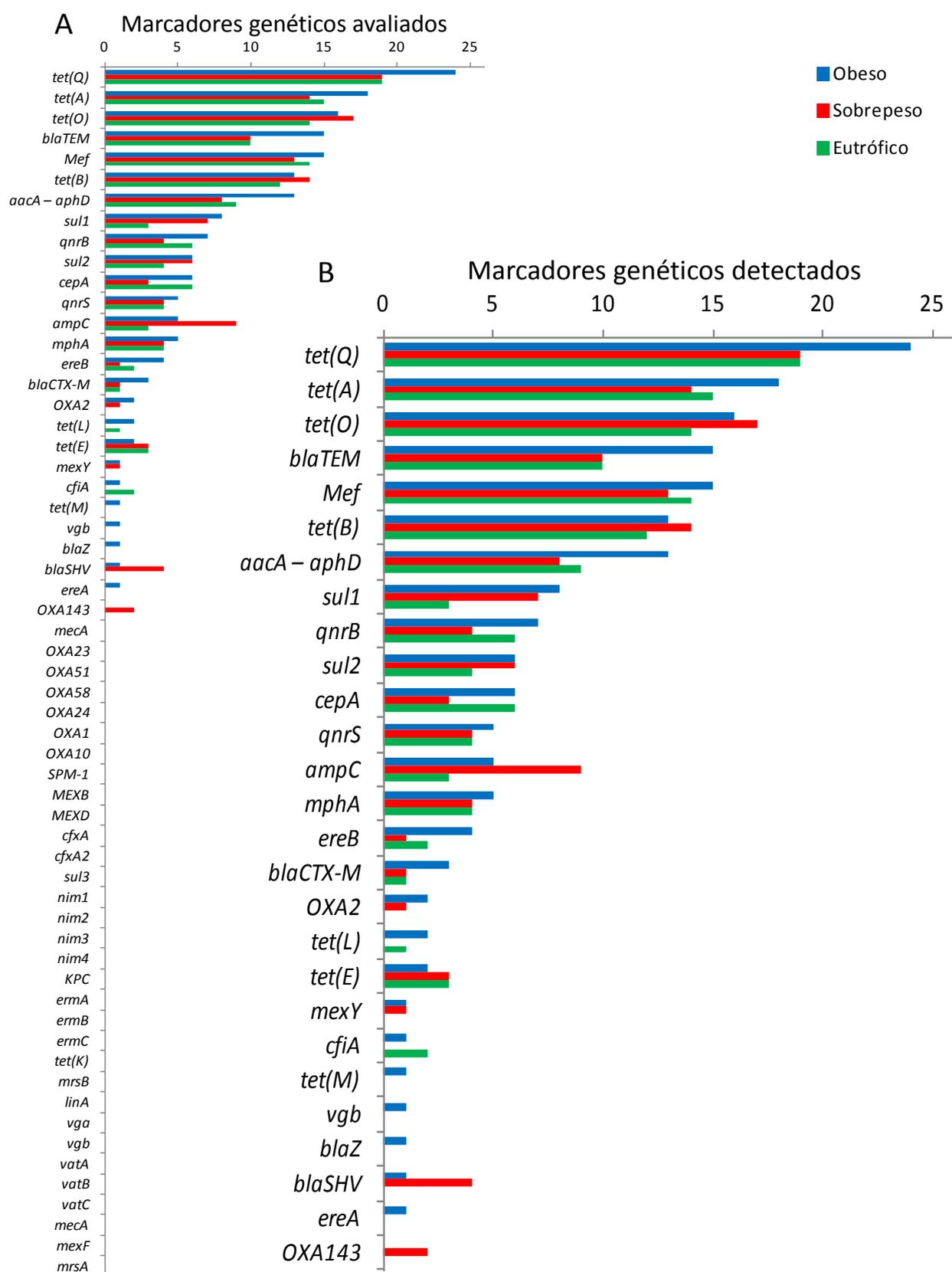


Figura 6. Distribuição de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas avaliados a partir metagenoma intestinal, representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. A: resistoma clínico avaliado; B: marcadores detectados.

Entre os marcadores detectados no resistoma clínico fecal dos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, aqueles referentes à resistência às tetraciclinas foram os mais observados em todos os grupos, seguidos de marcadores de resistência às drogas beta-lactâmicas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e quinolonas. Marcadores de resistência aos nitroimidazóis, macrolídeos lincosaminas e estreptoGraminas, além de bombas de efluxo ativo, também foram amostrados. De maneira geral, os marcadores foram detectados em maiores frequências entre os indivíduos do grupo obeso (Figura 7).

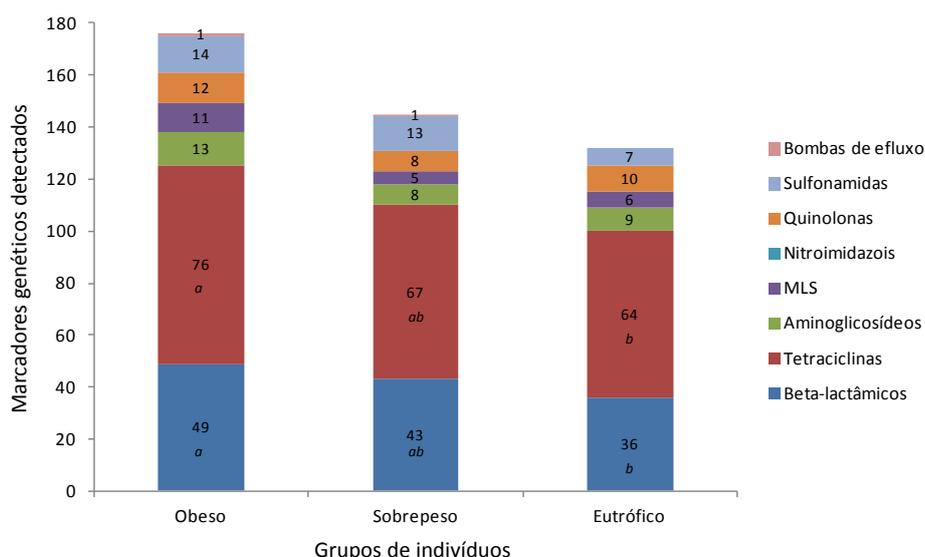


Figura 7. Ocorrência de marcadores genéticos, por grupo farmacológico de drogas antimicrobianas, entre os diferentes grupos, amplificados a partir metagenoma intestinal representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. As letras *a* e *b* indicam diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

Foram observados 17 tipos de marcadores que são comuns entre todos os grupos de indivíduos avaliados, pertencentes principalmente ao grupo das tetraciclinas, beta-lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas, macrolídeos e aminoglicosídeos. No grupo eutrófico, foram detectados 19 tipos de marcadores,

enquanto que no grupo de indivíduos com sobrepeso, 21 tipos foram detectados, com a presença exclusiva do gene *bla*<sub>OXA-143</sub>, relacionado com resistência a beta-lactâmicos em bastonetes Gram negativos não fermentadores. No grupo de indivíduos obesos, 26 tipos de genes foram detectados, com a presença exclusiva dos marcadores *bla*<sub>Z</sub>, *ereA*, *tet*(M) e *vgb*, relacionados com resistência a beta-lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, além de tetraciclina (Figura 8).

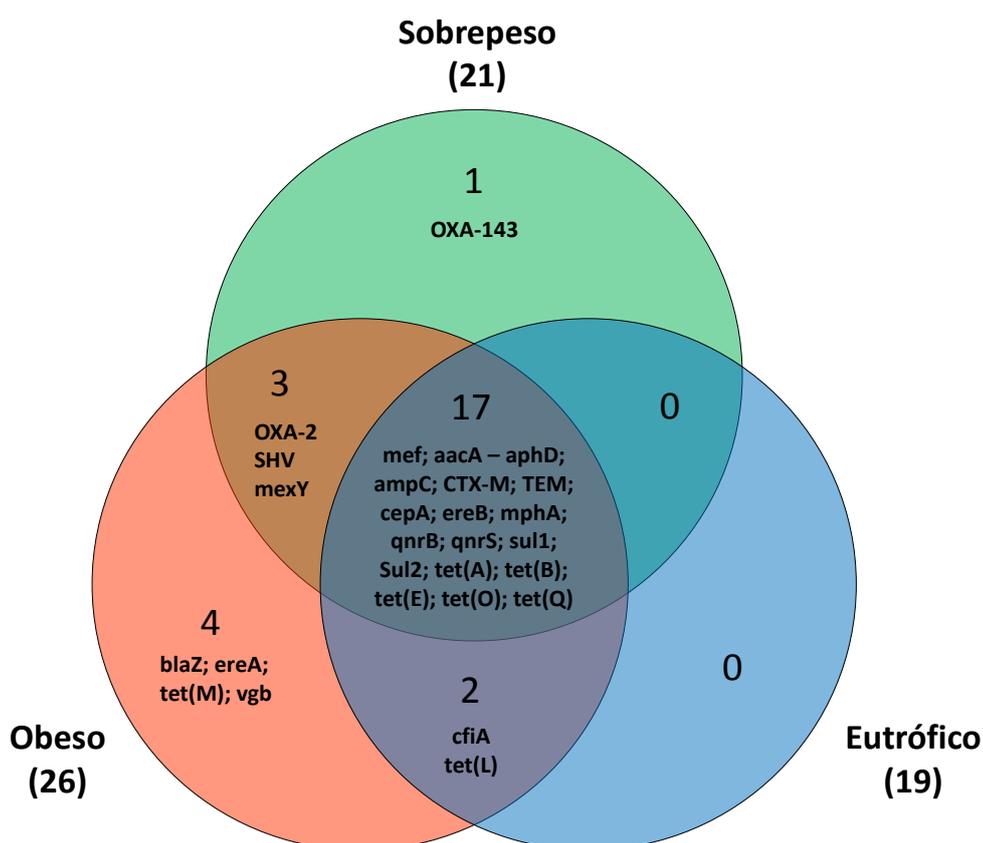


Figura 8. Diagrama de Venn com a distribuição dos marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas amplificados a partir metagenoma fecal, representativo do resistoma clínico de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos (27 dos 59 marcadores amostrados).

### 5.3 Avaliação quantitativa de espécies bacterianas por FISH

Foi realizada a análise por hibridização fluorescente *in situ* da densidade relativa das espécies bacterianas relacionadas com os marcadores de resistência, em relação à densidade bacteriana total. Para análise dos dados, posteriormente os diferentes grupos taxonômicos foram agrupados em: (i) bastonetes Gram negativos anaeróbios (*Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Bacteroides sp.*), (ii) bastonetes Gram negativos (*Acinetobacter sp.*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*), (iii) cocos Gram positivos (*Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*).

Como um todo, foi observado maior densidade bacteriana no grupo obeso, seguido pelos grupos com sobrepeso e eutrófico; porém sem diferenças significativas nos 3 grupos. Bastonetes Gram negativos anaeróbios foram detectados em maior quantidade, seguido pelos bastonetes Gram negativos e cocos Gram positivos. Os três grupos bacterianos estiveram aumentados no metagenoma fecal dos indivíduos obesos (Figura 9).

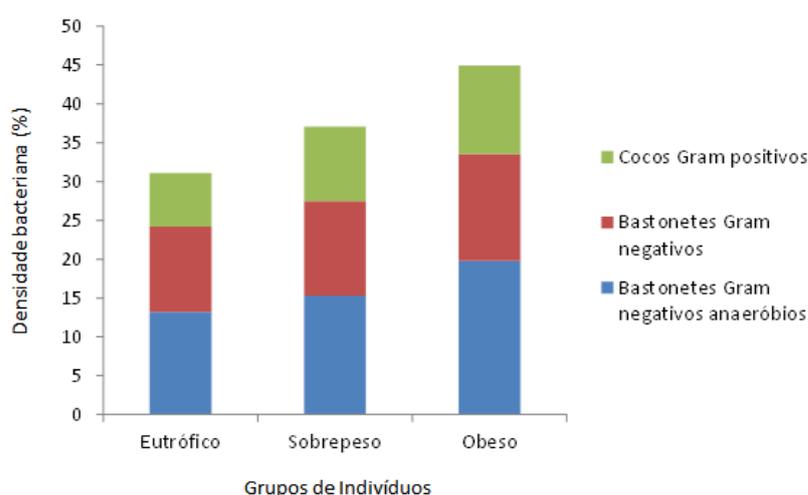


Figura 9. Densidade bacteriana relativa detectada a partir do metagenoma fecal, de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos. Não houve diferença significativa entre as densidades bacterianas avaliadas ( $p > 0,05$ )

Os grupos bacterianos encontraram-se diferentemente distribuídos. Existe uma maior densidade de bactérias do grupo *Fusobacterium sp.*, principalmente no grupo obeso, e diferenças significativas nas quantidades de *Enterococcus sp.* e *E. coli* entre os grupos eutrófico e obeso. No caso das outras espécies bacterianas estudadas, existem discretas diferenças na distribuição nos diferentes grupos, porém não são significativas (Figura 10).

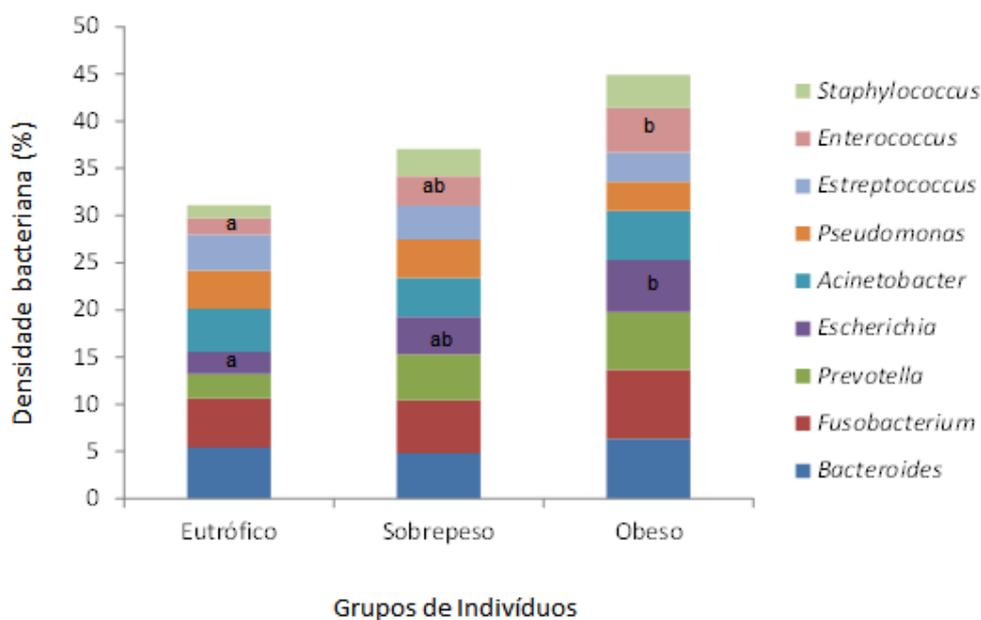


Figura 10. Densidade bacteriana relativa dos diferentes grupos taxonômicos detectados a partir do metagenoma fecal, de indivíduos eutróficos, sobrepeso e obesos. As letras a e b indicam diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

#### 5.4 Relação entre os parâmetros clínico-epidemiológicos e nutricionais, distribuição de grupos bacterianos e os marcadores de resistência a drogas observados nos metagenomas obtidos.

Para análise da relação entre os parâmetros clínico-epidemiológicos e nutricionais e os marcadores de resistência a drogas observados nos metagenomas obtidos; foram calculadas as razões de Odds entre os valores de IMC, ingesta calórica, uso de xenobióticos e uso de edulcorantes, foi estabelecido arbitrariamente a observação de pelo menos cinco marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas como parâmetro de corte, valor que corresponde numericamente em torno de 10% do total de marcadores avaliados.

Em todos os casos, foi observada correlação positiva entre uma detecção de marcadores de resistência a drogas no metagenoma fecal dos indivíduos obesos e os parâmetros avaliados

Tabela 5. Correlação entre os parâmetros nutricionais dos pacientes e numero marcadores de resistência detectados.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Odds ratio (Variação)</b>
IMC >25	2,14 (0,75 – 6,07)
Calorias (2000 Kcal)	1,44 (0,51 - 4,07)
Uso de Xenobióticos	1,93 (0,55 – 6,67)
Uso de edulcorante	1,6 (0,40 – 6,64)

Na avaliação da relação entre a densidade de grupos bacterianos estudados e a frequência de detecção de marcadores de resistência, a razão obtida sugere que os bastonetes Gram negativos anaeróbios exibem um maior número de marcadores de resistência no grupo dos indivíduos eutróficos, o que foi observado da mesma forma observado nos cocos Gram positivos.

Considerando-se os bastonetes Gram negativos, existe um maior número de marcadores de resistência a antibióticos nos grupos de indivíduos com sobrepeso e obesos em relação com a densidade bacteriana (Tabela 6).

Tabela 6. Razão entre o número de detecções de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, e a frequência relativa da densidade dos diferentes grupos bacterianos associados a esses marcadores.

<b>Grupos</b>	<b>Bastonetes Gram negativos anaeróbios</b>	<b>Bastonetes Gram negativos</b>	<b>Cocos Gram positivos</b>
Eutrófico	0,60	8,63	4,20
Sobrepeso	0,19	9,56	2,70
Obeso	0,35	9,36	3,51

## 7. DISCUSSÃO

A obesidade, atualmente, configura-se como um sério problema de saúde pública (WHO, 2010), sendo reconhecida como um fator negativo associado a um grande número de doenças, como diabetes do tipo 2, doenças vasculares, cardíacas e câncer. Suas complicações e implicações metabólicas são consideradas os principais desafios a serem combatidos no século XXI, uma vez que o número de obesos é crescente em todo o mundo, atingindo inclusive os países mais pobres ou em desenvolvimento (FLEGAL et al., 2007; DIXIT, 2008; PRENTICE, 2006).

Apesar de a obesidade ser historicamente associada a uma má alimentação com ingestão de excesso calórico e sedentarismo, estudos atuais sugerem a doença com alterações metabólicas, de causa multifatorial, com participação de hormônios, neuropeptídeos e citocinas e, ainda, participação da microbiota residente intestinal (MOREIRAS et al., 2013; PRENTICE, 2006; MOLLER et al., 2005). Epidemiologicamente, é aceito que a obesidade seja uma forma de agravo à saúde, relacionada, sobretudo, a pessoas do sexo feminino, com grande influência de fatores econômicos com implicações diretas na educação e comportamento. Por outro lado, a condição de sobrepeso é relatada ser mais comum em indivíduos do sexo masculino (MINISTERIO de SAUDE DO BRASIL, 2014; IBGE, 2009).

Neste estudo, foram avaliados 72 indivíduos, em uma amostragem por conveniência, recrutados na comunidade ou em serviço de nutrição de um hospital universitário, em uma cidade de porte médio na região sudeste do Brasil. De acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995), esses indivíduos foram classificados em eutróficos, com sobrepeso e obesos, avaliando-se suas características antropométricas, especialmente seu Índice de Massa Corporal (IMC). Assim, o grupo de indivíduos obesos foi formado por pessoas com uma idade

média de 47 anos, principalmente do sexo feminino que recebem entre 1 e 3 salários mínimos de referência no Brasil, em 2015. O grupo de indivíduos com sobrepeso apresentou uma distribuição muito mais equilibrada entre os sexos, mas ainda com predomínio de participantes de baixa renda, o que afeta a qualidade dos alimentos ingeridos por esses indivíduos (SNYDER, 2004).

O consumo de macronutrientes está de acordo com o esperado para a região sudeste do Brasil (ARAUJO et al., 2013). Porém, os pacientes obesos tiveram um consumo significativamente aumentado de calorias, carboidratos, lipídios e fibras, em comparação com os outros grupos. Uma alimentação rica em açúcares é característica da sociedade ocidental e já foi descrito amplamente que dietas aumentadas em carboidratos, principalmente carboidratos simples; permitem um balanço energético positivo, inflamação de baixo grau e modificações na permeabilidade intestinal levando ao estado de obesidade (JONASSON et al, 2014). Em relação ao consumo de no consumo de proteínas e lipídios, não houve diferença significativa no consumo entre os grupos.

Além disso, foi observado um maior uso de xenobióticos pelos pacientes obesos, entre eles anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-depressivos, anti-ácidos e edulcorantes. Por outro lado, o grupo de indivíduos eutróficos foi caracterizado pelo consumo de diferentes suplementos nutricionais como: whey protein, sulfato de glicosamina e condroitina. Os dados relacionados com as alterações da microbiota intestinal e o consumo de adoçantes artificiais não calóricos foram descritos por Suez et al. (2014). Porém, a presença de marcadores de resistência aos antibióticos no intestino e o consumo desses xenobióticos não tem sido descrito anteriormente.

Apesar da literatura não discutir os efeitos destes xenobióticos sobre a microbiota intestinal, e nem tão pouco foram dosados resíduos destas substâncias no trato gastrointestinal, nossos dados permitem sugerir que a carga de xenobióticos

ingerida possa atuar como agentes de pressão seletiva locais, reforçando a maior observação de genes de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma do grupo de indivíduos obesos. Deve-se considerar, no entanto, que embora o não uso prévio de antimicrobianos não possa garantir um ecossistema microbiano isento de desestruturação, esse viés foi igualmente considerando em todos os participantes.

Avanços recentes nas metodologias de estudo de ecossistemas microbianos tem permitido a caracterização da mudança na arquitetura da microbiota em seres humanos e de organismos-modelo, em resposta à antibioticoterapia (SOMER e DANTAS, 2011). Essas alterações incluem diminuição na diversidade filogenética do ecossistema microbiano previamente estável (DETHLEFSEN et al., 2008). De acordo com a literatura, embora a microbiota começa a se recuperar em direção aos estados de equilíbrio iniciais, em espaços de tempo de uma semana após a exposição aos antibióticos, esse estado de equilíbrio não é atingido antes de pelo menos meses ou anos após a exposição (DETHLEFSEN e RELMAN, 2011). É importante destacar que as alterações são mais ou menos persistentes, dependendo do espectro de ação dos antimicrobianos, como observado em modelos murinos com administração de diferentes regimes de uma ou várias drogas (ANTONOPOULOS et al., 2009).

Uma grande consequência da exposição repetida de antimicrobianos à microbiota é a observação de um aumento na abundância de marcadores de resistência, não apenas relacionado à continuidade da pressão seletiva, mas também pelo favorecimento de transferência gênica entre os microrganismos pelos mecanismos de recombinação genética bacteriana. Acredita-se, no entanto, que o desenvolvimento dessa microbiota alterada seja dependente da existência de níveis basais de resistência antibiótica entre os microrganismos daquele ecossistema. Mesmo na ausência de exposição a antimicrobianos por vias antropogênicas, outros

xenobióticos poderiam atuar na resistência cruzada ou na co-seleção (READY et al., 2004; ALLEN et al., 2010).

Ainda, especula-se sobre a presença de subpopulações de microrganismos resistentes na microbiota humana e de outros animais, independente de exposição prévia de drogas ou outros xenobióticos, tal como observado em ecossistemas ambientais mais primitivos ou isolados (VERSLUIS, 2015).

De acordo com a literatura, nos últimos 40 anos a prevalência de marcadores como *tet(Q)*, *tet(M)*, *ermF* e *ermG* tem sido aumentada no ecossistema intestinal em indivíduos que não receberam tratamento antimicrobiano, sugerindo a persistência destes determinantes na ausência de seleção causada pela presença de antibióticos (SHOEMAKER et al., 2001).

Neste sentido, estudos mais recentes tem revelado a presença de microrganismos resistentes às tetraciclina e outros antimicrobianos na microbiota oral de crianças que ainda não fizeram o uso de agentes antimicrobianos (LANCASTER et al., 2003). De acordo com a literatura, foi relatado que enterobactérias isoladas do trato gastrintestinal de voluntários humanos sem uso prévio de antimicrobianos por pelo menos um ano mostraram a presença de marcadores de resistência à pelo menos 13 drogas antimicrobianas (SOMMER et al., 2009). Ainda, mais recentemente, estudos realizados em índios da Amazonia venezuelana que nunca receberam tratamento antibiótico, mostraram a presença de marcadores de resistência no intestino dos participantes sem estímulo aparente (CLEMENTE, 2015).

No nosso estudo, foram avaliados 59 marcadores genéticos pertencentes ao resistoma clínico representativo de drogas antimicrobianas de uso rotineiro no tratamento e profilaxia de doenças infecciosas em seres humanos e outros animais. Foram detectados 27 genes de diferentes famílias de antibióticos, dos quais 17 são

compartilhados ou aparecem pelo menos uma vez nos diferentes grupos, o que indica a presença de um core ou núcleo comum de genes de resistência que está presente em todos os pacientes, independentemente do grupo. Esse núcleo está formado principalmente por marcadores de resistência a tetraciclina e beta-lactâmicos, seguido pelas quinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas, e esses achados estão de acordo com diferentes pesquisas, que tem mostrado a existência de um núcleo comum de marcadores de resistência (FORSLUND et al., 2013; VERSLUIS et al., 2015; CLEMENTE et al., 2015;).

Porém, a frequência de detecção e a variedade nos marcadores foi significativamente maior no grupo obeso, com a presença exclusiva de *tet(M)*, *ereA*, *blaZ* e *vgb*, que conferem resistência a tetraciclina, beta-lactâmicos e macrolídeos, respectivamente. No grupo com sobrepeso, houve uma frequência de detecção e variedade de genes maior, mas sem diferença significativa em comparação com o grupo eutrófico, porém significativamente menor que no grupo obeso e além disso, mostrou a presença exclusiva do marcador *bla<sub>OXA-143</sub>*, que confere resistência a beta-lactâmicos em não fermentadores. No grupo eutrófico, a frequência de detecção foi significativamente menor e não houve enriquecimento na variedade de marcadores detectados nem presença exclusiva de genes para esse grupo.

De maneira semelhante, outros estudos tem mostrado a existência de um núcleo de genes dentro do resistoma fecal, que é compartilhado pelos indivíduos independentemente se tiveram exposição aos antibióticos ou não, sugerindo que esses genes poderiam pertencer a bactérias comensais do intestino. Esse núcleo é formado principalmente por genes que conferem resistência a tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e cloranfenicol (BARTOLINI et al., 2003; MOORE et al., 2013; BENGSTON-PALMER et al., 2015; CLEMENTE et al., 2015; RAYMOND et al., 2015; VERSLUIS et al., 2015). Além disso, análise metagenômica

realizada por Forslund et al. (2013) mostraram que os genes de resistência mais abundantes no intestino estão relacionados aos antibióticos utilizados por tempo prolongado na prática clínica, principalmente aqueles usados como promotores de crescimento em animais, como é o caso da tetraciclina. As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro que foram descobertos em 1945 e tiveram um uso indiscriminado tanto na área clínica quanto na avicultura, sendo usados como promotores de crescimento em animais. Com o aumento da prevalência de resistência aos antibióticos, medidas para regular seu uso foram adotadas (ROBERTS, 1996). Assim, no Brasil, o uso de cloranfenicol, penicilinas, tetraciclinas e sulfonamidas foi proibido a partir de 1998; já no período de 2002 – 2004 foi proibido o uso de arsênico, antimônio, nitrofurano e olanquinox (SANTANA et al., 2011). Porém, o impacto ambiental do uso desses xenobióticos no ambiente tem tido implicações ambientais importantes e já foi mostrada a ampla presença de marcadores genéticos de resistência à tetraciclina no ambiente (VERSLUIS, 2015).

De maneira geral, as análises mostraram uma correlação positiva entre o IMC, a ingesta calórica, uso de xenobióticos, uso de edulcorantes e a detecção de pelo menos 5 marcadores genéticos no metagenoma amostrado. Estes resultados sugerem uma inter-relação entre o excesso de peso e o incremento no número de marcadores genéticos de resistência a antibióticos de importância clínica (resistoma clínico), a qual poderia estar relacionada com diversos fatores de pressão seletiva exclusivos do grupo obeso.

Embora alguns limites do intervalo inferior sejam menores do que um (1), o que poderia sugerir uma ausência de correlação, os limites do intervalo superior reforçam a tendência de uma correlação fortemente positiva entre as características antropométricas e nutricionais e a ocorrência dos genes de resistência entre os grupos.

Apesar da carência de estudos disponíveis na literatura para comparação desses resultados, os dados apresentados discordam daqueles descritos por Forslund et al (2013); que não encontraram relação entre o IMC e a presença de marcadores de resistência no intestino humano, em um estudo que avaliou o resistoma fecal de 252 indivíduos em 3 países. Porém, seus resultados em quanto aos marcadores genéticos achados são similares aos nossos.

Em relação aos parâmetros nutricionais de ingestão de carboidratos, proteínas e lipídios, a ampla variação nos níveis de consumo aceitáveis, de acordo com os guias nutricionais disponíveis, impossibilitaram a definição de um ponto de corte para as análises de correlação (IOM, 2005).

A avaliação da densidade de grupos bacterianos relacionados aos marcadores genéticos avaliados mostrou diferentes níveis populacionais, ao considerar-se os grupos de indivíduos amostrados. Considerando-se o agrupamento dos bastonetes Gram negativos anaeróbios, representados pelos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Fusobacterium*, foi observado um aumento significativo de *Fusobacterium* no metagenoma fecal dos indivíduos do grupo obeso; considerando-se o agrupamento dos bastonetes Gram negativos, representados por *E. coli*, *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter sp.*, um aumento significativo na espécie *E. coli* foi também observado no grupo de indivíduos obesos; e considerando-se o agrupamento dos cocos Gram positivos, representado pelos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, houve um aumento na densidade dos *Staphylococcus* e *Enterococcus*, porém sem diferença significativas no grupo de indivíduos obesos em comparação com grupos de indivíduos eutróficos e com sobrepeso.

Diferentes estudos tem demonstrado diferenças nas densidades bacterianas no intestino de pacientes obesos, porém, coincidem no incremento de *Enterococcus*,

*Prevotella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Acinetobacter* e *Fusobacterium* (ANGELAKIS et al., 2012 ; CHIU et al., 2014). Bactérias do gênero *Bacteroides* têm sido extensamente relacionadas com a presença de resistência a antibióticos, principalmente tetraciclina e macrolídeos (SHOEMAKER et al., 2001). Além disso, o aumento das bactérias do grupo das *Proteobacterias* em desequilíbrios energéticos no intestino já foi descrito por Shin, Won e Bae (2015), o que poderia explicar a presença aumentada de *E. coli* no intestino e os níveis de observação de marcadores de resistência associados a bastonetes Gram negativos, no nosso estudo.

Em relação à avaliação da relação entre os grupos bacterianos e a observação dos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos, embora não existam estudos disponíveis para comparação dos nossos resultados, a razão obtida permite sugerir que existe uma maior probabilidade de associação dos marcadores genéticos com os bastonetes Gram negativos principalmente nos grupos com sobrepeso e obeso. Como relatado anteriormente, apesar da detecção desses marcadores possa estar relacionada a níveis basais na população, ou consequência de pressão seletiva antimicrobiana anterior ao critério estabelecido no estudo, todos os indivíduos participantes estavam sujeitos ao mesmo viés. Assim, essa observação, considerando-se os bastonetes Gram negativos poderia estar relacionada com os diferentes xenobióticos ingeridos pelos indivíduos dos grupos com sobrepeso e obeso.

A mesma observação não poderia ser extrapolada, no entanto, para os bastonetes Gram negativos anaeróbios e cocos Gram positivos, sugerindo um aumento na pressão seletiva principalmente para o grupo dos bastonetes Gram negativos.

De maneira geral, a distribuição dos genes de resistência parece ser aumentada no metagenoma dos indivíduos eutróficos, considerando a densidade dos

bastonetes Gram negativos anaeróbios. Entretanto, é importante destacar que na microbiota fecal dos indivíduos com sobrepeso e obeso, a densidade relativa desses microrganismos estava aumentada. Esse fenômeno pode contribuir para uma diminuição no valor da razão entre o número de eventos de detecção de marcadores, e a frequência relativa bacteriana. O mesmo fenômeno foi observado para cocos Gram positivos e a distribuição de marcadores detectados entre os indivíduos.

Por outro lado, mesmo que a razão entre o número de eventos de detecção de marcadores e a frequência relativa dos bastonetes Gram negativos tenha sido maior nos grupos de indivíduos com sobrepeso e obesos, há de se considerar que a densidade desses microrganismos, nestes indivíduos, se mostrou aumentada. Esse fenômeno reforça a ideia da maior pressão seletiva para persistência de marcadores de resistência a drogas associados a enterobactérias e Gram negativos não fermentadores nos indivíduos com excesso de peso, associado à sua fisiologia e comportamento.

## 8 CONCLUSÕES

- Alteração na estrutura da microbiota residente intestinal está relacionada ao excesso de peso e os fatores associados, na população amostrada;
- Existe no resistoma clínico fecal humano, de maneira geral, um núcleo de genes de resistência que são compartilhados homogeneamente entre os indivíduos, os quais correspondem aos antibióticos de maior uso rotineiro na medicina humana e animal;
- Indivíduos com altos valores de IMC tem maior probabilidade da ocorrência de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma fecal;
- Indivíduos com alta ingesta calórica diária e que fazem uso rotineiro de xenobióticos, dentre eles adoçantes, tem maior probabilidade da ocorrência de marcadores genéticos de resistência a drogas antimicrobianas no metagenoma fecal;
- Entre indivíduos com sobrepeso e obesos, existe uma tendência de maior ocorrência entre genes de resistência a drogas antimicrobianas nos bastonetes Gram negativos intestinais em comparação com os bastonetes gram negativos anaeróbios e os cocos Gram positivos.

## 9 REFERÊNCIAS

AL-SAFFAR, F.; MIRANDA, D.T.; IBRAHIM, S.; SHUJAAT, A. 2015. How an opportunistic infection can mess with your Brain and take your breath away: A rare case of simultaneous lung and brain abscess due to *Streptococcus anginosus*. **Case Reports in Infectious Diseases**: 1-3.

ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, **8**: 251-259

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHULZE, R.; SPRING, S.; MOORE, E.; SCHLEIFER, G.H. 1996. rRNA targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomands. **Systematic Applied Microbiology**, **19**: 501 – 509.

ANGELAKIS, E.; ARMOUGOM, F.; MILLION, M.; RAOULT, D. 2012. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, **7 (1)**: 91–109.

ANTONOPOULUS, D.A.; HUSE, S.M.; MORRISON, H.G.; SCHMIDT, T.M.; SOGIN, M.L.; YOUNG, V.B. 2009. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infection and Immunology**, **77**: 2367-2375.

APAJALAHTI, J. 2005. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential Opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, **14**: 444–453.

ARAUJO, M.C.; BEZERRAL, I.N.; BARBOSA, F.S.; JUNGER, W.L.; YOKO, E.M.; PEREIRA, R.A.; SICHIERI, R. 2013. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, **47 (1)**: 177S-89S,

ARUYUTNOV, D.; FROST, L.S. 2013. F conjugation: Back to the beginning. **Plasmid**, **70**: 18 – 32.

ASSIF, M. 2014. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. **Journal of education and health promotion**, **3 (1)**: 1 – 25.

Associação brasileira para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. 2009 – 2010. Diretrizes brasileiras de Obesidade, 1 – 85.

BACKHED, F.; MANCHESTER, J.K.; SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Science**, **104 (3)**: 979 – 984.

BAQUERO, F.; TEDIM, A.P.; COQUE, T.M. 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in Microbiology**, **4 (15)**: 1 – 15..

BEHR, T.; KOOB, C.; SCHEDL, M.; MEHLEN, A.; MEIER, H.; KNOPP, D.; FRAHM, E.; OBST, U.; SCHLEIFER, K.; NEISSNER, R.; LUDWIG, W. 2000. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. **Systematic and Applied Microbiology**, **23**: 563 – 572.

BEIRAO, E.M.; PADOVAN, A.C.; FURTADO, J.D.; COLOMBO, A.L.; MEDEIROS, E.A. 2014. Does the change on gastrointestinal tract microbiome affects host? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**: 1- 4.

BENGSTON-PALMER, J.; ANGELIN, M.; HUSS, M.; KJELLQVIST, S.; KRISTIANSSON, E.; PALMGREN, H.; LARSSON, J.; JOHANSSONE, A. 2015. The Human Gut Microbiome as a Transporter of Antibiotic Resistance Genes between Continents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **59**: 6551 – 6560.

BIEDERMANN, L.; ROGLER, G. 2015. The intestinal microbiota: its role in health and disease. **European Journal of Pediatrics**, **174**: 151–167.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. 2000. The odds ratio. *Statistics notes*, 320: 1-2.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A.C. 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, **42 (1)**: 73 – 78.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; CHEHAB, O.; BOUCHAMI, O.; BENHASEN, A.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. 2007. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. **Journal of Infectious Diseases**, **60 (4)**:183-7.

CANI, P.D. 2013. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. **Briefings in Functional Genomics**, **12 (4)**: 381 – 387.

CHIU, C.M.; WEI, C.H.; WENG, S.L.; TSENG, H.C.; LIANG, C.; WANG, W.C.; YANG, T.L.; WENG, C.T.; CHANG, T.H.; HUANG, H.D. 2014. Systematic Analysis of the Association between Gut Flora and Obesity through High-Throughput Sequencing and Bioinformatics Approaches. **Biomed Research International**: 1- 10.

CARDOSO, M. A. & STOCCO, P. R. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Caderno Saúde Pública. Rio de Janeiro**, **16(1)**:107-114, jan-mar, 2000

CARLET, J.; JARLIER, V.; HARBARTH, S.; VOSS, A.; GOOSSENS, H.; PITTET, D. 2012. Ready for a world without antibiotics? The Pensières antibiotic resistance call to action. **Antimicrobial Resistance Infection Control**, **1 (11)**: 1 - 13.

CARVALO, A.C.; FORNARI, J.V.; BERNABE, A.S.; ARCARI, D.P.; FERRAZ, N.N. 2013. Prevalência de obesidade e comorbidades associadas em trabalhadores do ramo vidreiro. **Saúde em Foco**, **7**: 1 – 8.

CHUANCHUEN, R.; BEILINCH, K.; HOANG, T.T.; BECHER, A.; KARKHOFF-SCHWEIZER, R.R.; SCHWEIZER, H.P. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **45 (2)**: 428–432.

CLEMENTE, J.C.; PEHRSSON, E.C.; BLASER, M.J.; SANDHU, K.; GAO, Z.; WANG, B.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; CONTRERAS, M.; ALARCON, O.N.; LANDER, O.; MCDONALD, J.; COX, M.; WALTER, J.; OH, P.L.; RUIZ, J.F.; RODRIGUEZ, S.; SHEN, N.; SONG, S.J.; METCALF, J.; KNIGHT, R.; DANTAS, G.; DOMINGO, G. 2015. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science**: 1 - 12.

COX, L.M.; YAMANISHI, S.; SOHN, J.; ALEKSEYENKO, A.V.; LEUNG J.M.; CHO, I.; KIM, S.G.; LI, H.; GAO, Z.; MAHANA, D.; RODRIGUEZ, J.G.; ROGERS.; ROBINE,

N.; LOKE, P.; BLASER, M.J. 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. **Cell**, **158**: 705–721.

D’COSTA, V.M.; MCGRAN, K.M.; HUGHES, D.W.; WRIGHT, G.D. 2006. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, **311**: 374 – 376.

D’COSTA, V.M.; GRIFFITHS, E.; WRIGHT, G.D. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. **Current Opinion in Microbiology**, **10**: 481 – 489.

D’COSTA, V.M.; KING, C.E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W.W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G.B.; POINAR, H.N.; WRIGHT, G.D. 2011. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, **00 (1)**: 1-5.

DANTAS, G.; SOMMER, M.O.; OLUWASEGUN, R.D.; CHURCH, G.M. 2008. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**, **320**: 100 – 103.

DANTAS, G.; SOMMER, O.A. 2012. Context matters — the complex interplay between resistome. **Current Opinion in Microbiology**, **15**: 577–582 genotypes and resistance phenotypes

DAS, U.N. 2010. Obesity: Genes, brain, gut, and environment. **Nutrition**, **26**: 459 – 473.

DAVID, E.; KAUFFMAN, K.D. 2005. Metabolic Syndrome: A Clinical and Molecular Perspective, **Annual Review of Medicine** **56**: 45 – 53.

DAVIES, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, **264**: 375 – 381.

DAVIES, J. 2006. Where have all the antibiotics gone?. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, **17 (5)**: 287 – 289.

DAVIES, J.; DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **74 (3)**: 417–433.

DEFTHLEFSEN, L.; HUSE, S.; M.L. SOGIN, D.A. RELMAN. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS ONE**, **6**: 280 – 289.

DETHLEFSEN, L.; D.A. RELMAN. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation.

**Proceedings of the National Academy of Science, 108 (1):** 4554 – 4561.

DEMANECHE, S.; SANGUIN, H.; POTÉ, J.; NAVARRO, E.; BERNILLON, D.; MAVINGUI, P.; WIDI, W.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. **Proceedings of the National Academy of Science, 105 (10):** 3957–3962.

DE CHAMPS, C.; POIREL, L.; BONNET, R.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. Prospective survey of  $\beta$ -lactamases produced by ceftazidim resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(2):** 3031-3034, 2002.

DIXIT, V.D. 2008. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of Leucocyte Biology, 84:** 882-892

EI AMIN, N.; GISKE, C.G.; JALAL, S.; KEIJSER, B.; KRONVALL, G.; WRETLIND, B. 2005. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. **APMIS, 113:**187-196, 2005.

FALLANI, M.; AMARRI, S.; UUSIJARVI, A.; ADAM, R.; KHANNA, S.; AGUILERA, M; GIL, A.; VIEITES J.M.; NORIN, E.; YOUNG, D.; SCOTT, J.A.; DORE, J.; EDWARDS, C.A. 2011. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five european centres. **Microbiology, 157:** 1385 – 1392.

FAJARDO, A.; MARTINEZ, N.M.; MERCADILLO, M.; GALAN, J.C.; GHYSELS, B.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.L. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS ONE, 3 (2):** 1 - 6.

FISCHBACH, M.A.; WALSH, M.A.; CLARDY, J. 2007. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (12):** 4601– 4608.

FISCHBACH, M.A. 2009. Antibiotics from microbes: Converging to kill. **Current Opinion in Microbiology**, **12 (5)**: 520–527.

FLEGAL, K.M. GRAUBARD, B.I. WILLIAMSON, D.F. GAIL, M.H. 2007. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. **Journal of Nutrition**, **298**: 2028 - 2037

FLINT, H.J.; BAYER, E.A; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature**, **6**: 121-130.

FOUHY, F.; GUINANE, C.M.; HUSSEY, S.; WALL R.; RYAN, A.C.; DEMPSEY, E.M.; MURPHY, B.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C.; COTTER, P.D. 2012. High-throughput sequencing reveals the incomplete, 4 short-term, recovery of the infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **56 (11)**: 5811 - 5820.

FORSLUND, K.; SUNAGAWA, S.; KULTIMA, J.R.; MENDE, D.R.; ARUMUGAN, M.; TYPAS, A.; BORK, P. 2013. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. **Genome Research**, **23**: 1163 – 1169.

FORSLUND, K.; SUNAGAWA, S.; COELHO, L.P.; BORK, P. 2014. Metagenomic insights into the human gut resistome and the forces that shape it. **Bioessays**, **36**: 316–329.

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

GALAN, J.C.; CANDELAS, F.G.; ROLAIN, J.M.; CANTON, R. 2013. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the  $\beta$ -lactamases world. **Frontiers in Microbiology**, **4 (9)**: 1 – 16.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**: 699-702, 2003.

GILLINGS, M.R.; PAULSEN, I. T.; TETU, S.G. 2015. Ecology and Evolution of the Human Microbiota: Fire, Farming and Antibiotics. **Genes**, **6**: 841 – 857.

GILLINGS, M.R.; STOKES, H.W. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability?. **Trends in Ecology and Evolution**, **27 (6)**: 346 – 352.

GILLINGS, M.R. 2013. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, **4 (4)**: 1 – 10.

GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I.; FOSSE, T. 2003. Sequence analysis of cfxA2-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **(51)**: 1293–1296.

GMUR, R.; WYSS, C.; XUE, Y.; THURNHEER, T.; GUGGENHEIM, B. 2004. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. **European Journal of Oral Science**, **112**: 33 – 41.

GMUR, R.; THURNHEER, T. 2002. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical samples. **Microbiology**, **148**: 1379 - 1387

GRAPE, M.; SUNDSTROM, L.; KRONVALL, G. 2003. Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**: 1022–1024.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. 2012. The human microbiome: Our second genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, **13**: 151–70.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. 2003. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, **360**: 512–19.

HARLEY, T. W.; KARP, C.L. 2012. Obesity and the gut microbiome: Striving for causality. **Molecular Metabolism**, **1**: 21 – 31.

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. 2004. The causes of intestinal dysbiosis: A review. **Alternative Medicine Review**, **9 (2)**: 180 – 197.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* **International of Journal Antimicrobial Agents**, **35**: 305-307, 2010.

HINDI, A.K.; SHUBBAR, E.E.; ADDO, S.A. 2013. Molecular Study on distribution of *sul1* and *sul2* genes among *Salmonella enterica* causing Enteric Fever. **Magazine of Al-Kufa University for Biology**, **5 (2)**: 1 – 9.

HOOPER, L.V.; LITTMAN, D.R.; MACPHERSON, A.J. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, **336**: 1268-1273.

HUGHES, R.; ROWLAND, I. R. 2000. Metabolic activities of the gut microflorao in Relation to Cancer. **Microbial Ecology in Health and Disease**, **2**: 179–185

JERNBERG, C.; LOFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J.K. 2010. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, **156**: 3216 – 3223.

JIMENEZ, E.; MARÍN, M.L.; MARTÍN, R.; ODRIUZOLA, J.M.; OLIVARES, M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, **159**: 187-193.

JONASSON, L.; GULDBRAND, H.; LUNBERG, A.K.; NYSTROM, F.H. 2014. Advice to follow a low-carbohydrate diet has a favourable impact on low-grade infl ammation in type 2 diabetes compared with advice to follow a low-fat diet. **Annals of Medicine**: 1 – 6.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A. 2009. Characterization and sequence analysis of extended spectrum B-lactamase encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonie*, and *Proteus mirabilis* isolates during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53 (2)**: 465 – 475,

KABAT, A.M.; SRINIVASAN, N.; MALOY K.J. 2014. Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. **Trends in Immunology**, **35 (11)**: 507 – 517.

KIM, H.B.; PARK, C.H.; KIM, C.J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, C. 2009. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **53 (2)**: 639 – 645.

KIM, D. 2015. Gut microbiota-mediated drug-antibiotic interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, **43**: 1581–1589.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C.A. 2007. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, **130**: 797–810.

LAM, Y.Y.; CONNIE, W.Y.; HOFFMAN, J.A.; OSCARSSON, J.; DINUDOM, A.; MATHER, T.J.; COOK, D.I.; HUNT, N.H.; HOLMES, H.J.; STORLEN, L.H. 2015. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity**, **23**: 1429 – 1439.

LANCASTER, H.; READY, D.; MULLANY, P.; SPRATT, D.; BEDI, R.; WILSON, M. 2003. Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. **FEMS Microbiology Letters** **228**: 99-104.

LESTER, C.H.; MOLLER, N.F.; SORENSEN, T.L.; MONNET, D.L.; HAMMERUM, A.M. 2006. In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50 (2)**: 596 – 599.

LEVY, S.B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**: 46 – 53.

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON J.I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, **124**: 837 – 848.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. 2006. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, **444 (21)**: 1022 – 1023.

LIM, S.S.; VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; DANAEI, G.; SHIBUYA, K.; ADAHIR-ROHANI, H.; AMANN, M.; ANDERSON, H.R.; ANDREWS, K.G. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **National Institute of Health**, **380**: 2224 – 2260

LIN, W.Y.; LEE, L.T.; CHEN, C.Y.; LO, H.; HSIA, H.H.; LIU, I.L.; LIN, R.S.; SHAU, W.Y.; HUANG, K.C. 2002. Optimal cut-off values for obesity: using simple anthropometric indices to predict cardiovascular risk factors in Taiwan. **International Journal of Obesity**, **26**: 1232 – 1238.

LINDBERG, E.; NOWROUZIAN, F.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E. 2000. Long-time persistence of superantigen producing *Staphylococcus aureus* strains in the intestinal microflora of healthy infants. **Pediatric Research**, **48 (6)**: 741– 747.

LIVERMORE, D.M. 2003. Overstretching the mutant prevention concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**, 732.

LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiological Review**, **58 (3)**: 563 – 602.

LU, K.; ABO, R.P.; SCHLIEPER, K.A.; GRAFFAM, M.E.; LEVINE, S.; WISHNOK, J.S.; SWENBERG, J.A.; TANNENBAUM, S.R.; FOX, J.G. Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: An integrated metagenomics and metabolomics analysis. **Environmental Health Perspectives**, **122 (3)**: 284 – 291.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 1. p. 175–184.

MAURICE, F.C.; HAISER, H.J.; TURNBAUGH, J. 2012. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. **Cell**, **152**: 39– 50.

MANCO, M.; FERNANDEZ-REAL, J. M.; EQUITANI, F.; VENDRELL, J.; VALERA MORA, M. E.; NANNI, G.; TONDOLO, V.; CALVANI, M.; RICART, W.; CASTAGNET, M.; MINGRONE, G.. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, V. 92, N. 2, P. 483-490, jul. 2007.

MARCHESI, J.R.; ADAMS, D.H.; FAVA, F.; HERMES, G.D.; HIRSCHFIELD, G.M.; HOLD, G.; QURAIISHI, M.N.; KINROSS, J.; SMIDT, H. TUOHY, M.K.; THOMAS, V.L.; ZOETENDAL, E.G.; HART, A. 2015. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, **0**: 1 – 10.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; BERGERON, M.G. 2000. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **44 (2)**: 231–238.

MINISTERIO DA SAUDE. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Vigitel 2014: 1 – 37.

MOREIRA, A.P.; TEXEIRA, T.F.; FERREIRA, A.B.; PELUZIO, M.C.; ALFENAS, R.C. 2012. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, **108**: 801 – 809.

MOREIRAS, G.V.; MERINO, L.F.; APERTE, E.A.; BARTRINA, J.A.; TORRES, J.M.; LAIN, S.A.; CORTES, S.B.; GARCIA, L.C.; SAAVEDRA, M.A.; RUBIO, A.D.; AZA, M.G. 2013. Obesidad y sedentarismo en el siglo XXI: ¿qué se puede y se debe hacer. **Nutricion Hospitalaria** **2013**; **28 (5)**: 1-12

MORIN, G.M.; MADINIER, I.; FOSSE, T. 2002. Sequence analysis of cfxA2-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **51**: 1293–1296

MOORE, A.M.; PATEL, S.; FORSBERG, K.J.; WANG, B.; GAYLE, B.; RAZIA, Y.; QIN, X.; TARR, P.I.; DANTAS, G. 2013. Pediatric Fecal Microbiota Harbor Diverse and Novel Antibiotic Resistance Genes. **Plos One**, **8 (11)**: 1 – 9.

MOORE, A.M.; AHMADI, S.; PATEL, S.; GIBSON, M.K.; WANG, B.; Ndao, M.; DEYCH, E. 2015. Gut resistome development in healthy twin pairs in the first year of life. **Microbioma**, **3 (27)**: 2-10.

MUNIESA, M.; LLUCH, M.C.; JOFRE, J. 2013. Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacteria populations? **Mobile Genetic Elements**, **3 (4)**: 258471 - 258474.

NAKANO, V.; SILVA, A.N. MERINO, V.R., WEXLER, H.M. 2011. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. **Clinical Science**, **66 (4)**: 543-547

NAAS, T.; BENAODIA, F.; MASSUARD, S.; NORDMANN, P. 2000. Integron-located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **46**: 703–711.

NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H. 1995. Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. **Systemic and Applied Microbiology**, **18**: 113 – 122.

NG, L.K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. 2001. **Molecular and Cellular Probes**, **15**: 209–215.

NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E.; WILSON, I.D. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. **Nature**: 1 – 8.

ODEH, R.; KELKAR, A.M.; BONOMO, R.A.; SCHRECKENBERGER, P.C.; QUINN, J.P. 2002. Broad resistance due to plasmid mediated ampC B-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, **35**: 140 – 145.

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. **European Molecular Biology Organization reports**, **7 (7)**: 688 – 693.

OSBOURN, A. 2010. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. **Trends in Genetics**, **26**: 449 – 457.

PEACOCK, S.J. 2005. Staphylococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. 772 – 731.

PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. 2010. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, **33 (3)**: 700 – 706.

PERRY, J.A.; WRIGHT, G.D. 2014. Forces shaping the antibiotic resistome. **Bioessays**, **36**: 1- 5.

PERRY, J.A.; WESTMAN, E.L.; WRIGHT, G.D. 2014. The antibiotic resistome: what's new? **Current Opinion in Microbiology**, **21**: 45–50.

PHAM, T.A.; LAWLEY, T.D. 2014. Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. **Current Opinion in Microbiology**, **17**: 67–74.

POIREL, L.; BONNIN, R.A.; NORDMANN, P. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. **Life**, **63 (12)**: 1061–1067.

POSSEMIERS, S.; GROOTAERT, C.; VERMEIREN, J.; GROSS, G.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T.V. 2009. The Intestinal Environment in Health and Disease – Recent Insights on the Potential of Intestinal Bacteria to Influence Human Health. **Current Pharmaceutical Design**, **15**: 2051-2065

PRENTICE, A.M. 2006. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, **35**: 93 -99.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMURGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, **464**: 60 - 65.

RAYMOND, F.; OUAMEUR, A.A.; DÉRASPE, M.; IQBAL, N.; HELENE, G.; DRIDI, B.; LEPROHON, P.; PLANTE, P.L.; GIROUX, R.; BERUBE, E.; FRENETTE, JOHANNE, BOUDREAU, D.K.; SIMARD, J.L.; CHABOT, I. 2015. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. **The International Society for Microbial Ecology Journal**: 1 – 14.

READY, D.; LANCASTER, H. QURESHI, F.; BEDI, R.; MULLANY, P.; WILSON, M. 2004. Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**: 2883-2887

RIGOTTIER-GOIS, L.; ROCHET, V.; GARREC, N.; SUAUI, J. 2003. Enumeration of Bacteroides species in human faeces by fluorescent *in situ* hybridization combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. **Systematic and Applied Microbiology**, **26**: 110 – 118.

ROBERTS, M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews** **19**: 1-24.

ROMERO, D.; TRAXLER, M.F.; LOPEZ, D.; KOLTER, R. 2011. Antibiotics as signal molecules. **Chemical Reviews**, **111 (9)**: 5492 – 5505.

ROSENBAUN, M.; KNIGHT, R.; LEIBEL, R.L. 2015. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, **1054**: 1-9.

RUPPÉ, E.; ANDREMONT, A. 2013. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. **Frontiers in Microbiology**, **4 (129)**: 1 – 10.

RUSELL, S.L.; GOLD, M.J.; HARTMANN, M.; WILLING, B.P.; THORSON, L.; WLODARSKA, M.; GILL, N.; BLANCHET, M.; MOHN, W.W.; MCNAGNY, K.M.; FINLAY, B. 2012. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. **European Molecular Biology Organization Reports**, **13 (5)**: 440 – 446.

SALES, R. L.; COSTA, N. M. B.; SILVA, M. M. S. 2004. Avaliando o consumo alimentar por fotos. **Universidade Federal de Viçosa**: 1 – 40.

SALYERS, A.A.; GUPTA, A.; WANG, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, **12 (9)**: 412 - 416.

SANTANA, E.S.; OLIVEIRA, F.H.; BARNABE, A.C.; MENDES, F.M.; ANDRADE, M.A. 2011. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Centro científico conhecer**: 1 – 21.

SATOKARI, R.; GRONROOS, T.; LAITINEN, K.; SALMINEM, S.; ISOLAURI, E. 2009. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human Placenta. **Letters in Applied Microbiology**, **48**: 8 – 12.

SCHEPPACH, W. 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**: 35 – 38.

SCHWABER, M.J.; VENEZIA, S.N.; SCHWARTZ, D.; CARMELI, Y. 2005. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum B-lactamase producing *enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49 (5)**: 2137–2139.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M.; GROSSART, H. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, **4 (47)**: 1 – 13.

SHANAHAN, F. 2002. The host–microbe interface within the gut. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, **16 (6)**: 915 – 931.

SHANNON, L.R.; MATTHEW, J.G.; HARTMANN, M.; SHANNON L.; WILLING, B.P.; THORSON, L.; WLODARSKA, M.; GILL, N.; BLANCHET, M.; MOHN, W.W.; MCNAGNY K.M.; FINLAY, B.B. 2012. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. **European Molecular Biology Organization Reports**, **13 (5)**: 440 -447.

SHIN, N.R.; WHON, T.W.; BAE, J.W. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**: 1 – 8.

SHOEMAKER, N.B.; VLAMAKIS, H.; HAYES, K.; SALYERS, A.A. 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides spp.* and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, **67 (2)**: 561 – 568.

SHULMAN, S.T.; FRIEDMANN, H.C.; SIMS, R.H. 2007. Theodor Escherich: The first pediatric infectious diseases physician?. **Clinical Infectious Diseases**, **45**: 1025 - 1029.

SMITH, A. G.; SHERIDAN, P. A.; HARP, J. B.; BECK, M. A. 2007. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *Journal of Nutrition*, v.137, p. 1236-1243.

SPEAKMAN, J.R. 2004. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *Journal of nutrition*. 134 – 209.

SOCIAL SCIENCE STATISTICS. 2015. Disponível em: <[http://www.iri.usp.br/documentos/ref\\_ABNT\\_Chicago\\_Out12.pdf](http://www.iri.usp.br/documentos/ref_ABNT_Chicago_Out12.pdf)> Acessado em: 23 de Outubro 2015.

SOMMER, M.O.; DANTAS, G.; CHURCH, G.M. 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**, **325**:1128-1131.

SOMMER, F.; BACKHEAD, F. 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**: 1 – 12.

SONNENBURG, J.L.; XU, J.; LEIP, D.D.; CHEN, C.H.; WESTOVER, B.P.; WEATHERFORD, J.; BUHLER, J.D.; GORDON, J.I. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. **Science**, **307**: 1955 – 1959.

SÓKI, J.; FODOR, E.; HECHT, D.W.; EDWARDS, R.; ROTIMI, V.O.; KEREKES, I.; URBAN, E.; NAGY, E. 2004. Molecular characterization of imipenem-resistant, cfiA-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. 2004. **Journal of Medical Microbiology**, **53**: 413 – 419.

SOUZA R.J.; MENTE A.; MAROLEANU, A.; COZMA A.I.; HA V.; KISHIBE T.; ULERYK E.; BUDYLOWSKI P.; SCHÜNEMANN H.; BEYENE J.; ANAND S.S. 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **British Medical Journal**: 1- 56.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WITTE, W. 2003. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (9): 4089 – 4084.

SUEZ, J.; KOREM, T.; ZEEVI, D.; SCHAPIRA, G.Z.; THAISS, C.A. MAZA, O.; ISRAELI, D.; ZMORA, N.; GILAD, S.; WEINBERGER, A.; KUPERMAN, Y.; HARMELIN, A.; KOLODKIN-GAL, I.; SHAPIRO, H.; HALPERN, Z.; SEGAL, E.; ELINAV, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature** **514**: 181–186

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; AMELIA, T.; WONDRACK, L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **40** (11): 2562–2566

SWANSON, H. 2015. Drug metabolism by the host and gut microbiota: A partnership or rivalry?. **Drug Metabolism and Disposition**, **43**: 1499–1504

TACONELLI, E. 2012. Burden of *Staphylococcus aureus* endocarditis: how real is the threat?. **Infection hot topic**, **18** (2): 107 – 108.

TAVARES, W. 2001. Bactérias Gram-positivas problemas; Resistencia do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **33** (3): 281 – 301.

TAVARES, B.T.; NUNES, S.M.; SANTOS, M.O. 2010. Obesidade e qualidade de vida: revisão da literatura. *Revista Médica Minas Gerais*, 20 (3): 359-366.

THORNBURN, A.N.; MACIA, L.; MACKAY, C.R. 2014. Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” **Inflammatory Diseases**. *Immunity*, **40 (6)**: 833 – 842.

TREBESIOUS, K.; LEITRITZ, L.; ADLER, K.; SCHUBERT, S.; AUTENRIETH, I. B.; HEESEMANN, J. 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotizing fasciitis and *streptococcal* toxic shock syndrome by fluorescence *in situ* hybridization. **Medical Microbiology and Immunology**, **188**: 169 – 175.

TREMELLEN, K.; PEARCE, K. 2012. Dysbiosis of gut microbiota (DOGMA) A novel theory for the development of polycystic ovarian syndrome. **Medical Hypotheses**, **79**: 104 – 112.

TRINH, S.; REYSSET G. 1996. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, **34 (9)**: 2078–2084

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON C.G. 2000. Expression of resistance tetracyclines in strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **45**: 763 – 770.

UNDERWOOD, M.A. 2014. Intestinal dysbiosis: Novel mechanisms by which gut microbes trigger and prevent disease. **Preventive Medicine**, **165**: 133 – 137.

VALERA MORA, M. E.; MANCO, M.; CAPRISTO, E.; GUIDONE, C.; IACONELLI, A.; GNIULI, D.; ROSA, G.; CALVANI, M; MINGRONE, G. 2007. Growth hormone and ghrelin secretion in severely obese women before and after bariatric surgery. *Obesity*, V. 15, P. 2012-2018.

VERSLUIS, D.; D’ANREA, M.M.; GARCIA, J.R.; LEIMENA, M.M.; HUGENHOLTZ, F.; ZHANG, J.; OSTURK, B.; NYLUNDS, LOTTA.; SIPKEMA, DETMER.; SCHAIK, W.V.; VOS, W.; KLEEREBEZEM, M. 2015. Mining microbial metatranscriptomes for expression of antibiotic resistance genes under natural conditions. **Scientific Reports**: 1-10.

VOGT, S.L.; DIAZ, J.; FINLAY, B.B. 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. **Anaerobe**, **15**: 30019-6.

VREUGDENHIL, A.C.; ROUSSEAU, C.H.; HARTUNG, T.; GREVE, J.W.; VAN TEER, C.; BUURMAN, W.A. 2003. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. **The Journal of Immunology**, **170**: 1399 – 1405.

WAGNER, M. ERHART, R.; MANZ, W.; AMANN, R.; LEMMER, H.; WEDI, D.; SCHELEIFER, K.H. 1994. Development of an rRNA targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**: 792 – 800.

WALKER, A.; PFITZNER, B.; NESCHEN, S.; KAHLE, M.; HARIR, M.; LUCIO, M.; MORITZ, F.; TZIOTIS, D.; WITTING, M.; ROTHBALLER, M.; ENGEL, M.; SCHMID, M.; ENDESFELDER, D.; KLINGENSPOR, M.; RATTEI, T.; CASTELL, Z.C.; HARTMANN, A. 2014. Distinct signatures of host–microbial meta-metabolome and gut microbiome in two C57BL/6 strains under high-fat diet. **International Society for Microbial Ecology**, **8**: 2380–2396.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **95**: 6578 - 6583.

WILLMAN, M.; EL-HADIDIC, M.; HUSONC, D.H.; SCHUTZA, M.; WEIDENMAIERA, C.; PETERA, S. 2015. Antibiotic selection pressure determination 1 through sequence-based metagenómicas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: 1 – 33.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. 2006. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, **35 (5)**: 736-755, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **World Health Organization**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. **World Health Organization**: 1 – 96.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**: 1 – 232.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. Global status report on non communicable diseases. **World Health Organization**, 1 – 302

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1995. WHO Expert Committee on Physical Status. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: **World Health Organization. WHO Technical report series**, 854.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal Antimicrobial Agents**, **4**: 351-353, 2006.

WOPEREIS, H.; OOZEER, H.; KNIPPING, BELZER, C.; KNOL, J. 2014. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. **Pediatric Allergy and Immunology**, **25**: 428 – 438.

WRIGHT, G.D.; SUTHERLAND, A.D. 2007. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, **13 (6)**: 260 – 267.

WRIGHT, G. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, **13**: 589–594.

XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, R.C.C.; GALES, A.C. 2010. Efflux pumps expression and its association with porin down regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BioMed Central Microbiology**, **10**: 1-7, 2010.

XU, J; GORDON, J.I. 2003. Honor thy symbionts. **Proceedings of the national academy of science**, **100 (18)**: 10452 – 10459.

YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R.N.; ANOKHIN, A.P.; HEATH, A.C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, G.; LOZUPONE, C.A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, **486**: 222 – 227.

YONEDA, K.; CHIKUMI, H.; MURATA, T.; GOTOH, N.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, H, NISHINO, T.; SHIMIZU, E. 2005. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa*

multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, **243**: 125-131.

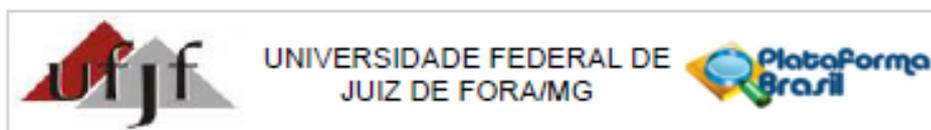
ZHANG, Y.; ZHANG, H. 2013. Microbiota associated with type 2 diabetes and its related complication. **Food Science and Human Wellness**, **2**: 167 – 172.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. 2004. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, **42 (11)**: 4947 – 4955

ZHANG, N.; HUAN, Y.; HUANG, H.; SONG, G. M.; SUN, S. J.; SHEN, Z. F. 2009. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 31, p. 35-42.

## 8 Anexos

### 8.1 Anexo 1: Parecer Cosubstanciado do CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
JUIZ DE FORA/MG

Plataforma  
Brasil

#### PARECER COSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Microbiota, sistema imunológico e obesidade: diversidade microbiana intestinal e parâmetros imunológicos de indivíduos obesos e eutróficos.

**Pesquisador:** Claudio Galuppo Diniz

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23895013.9.0000.5147

**Instituição Proponente:** Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 479.002

**Data da Relatoria:** 07/11/2013

##### Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto esta clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

##### Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos.

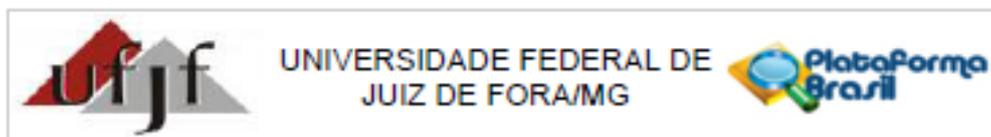
##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS.

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está em configuração adequada e há apresentação de declaração de Infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável da Instituição onde será realizada a pesquisa. Apresentou de forma adequada o termo de Consentimento Livre e

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 38.036-900  
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesoc@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 479.002

Esclarecido. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: 30/11/2015

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 04 de Dezembro de 2013

---

Assinador por:  
Paulo Cortes Gago  
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
Bairro: SAO PEDRO CEP: 38.038-000  
UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

## 8.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF  
36206-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

### **ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **"MICROBIOTA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E OBESIDADE: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E EUTRÓFICOS"**.

Nesta pesquisa pretendemos avaliar a diversidade bacteriana, seu perfil funcional e metabólico, e parâmetros imunológicos de indivíduos obesos e eutróficos para o estabelecimento de possíveis correlações entre composição microbiana, atividade imunológica, perfil nutricional e bioquímico, e a obesidade.

De acordo com os órgãos internacionais de saúde, investigações direcionadas ao entendimento dos fatores envolvidos na etiopatologia da obesidade considerando-se aspectos imunológicos e da microbiota residente intestinal deverão contribuir para minimizar o impacto para saúde pública dos custos associados às comorbidades e os custos sociais da doença, dada sua prevalência.

Acreditamos que esta pesquisa possa contribuir para dimensionar a distribuição bacteriana na microbiota residente intestinal de pacientes obesos, seu papel no ecossistema pela determinação dos perfis funcionais e metabólicos, e aspectos da resposta imunológica sistêmica nestes indivíduos.

Esses conhecimentos poderiam contribuir e suscitar discussões sobre o envolvimento destas variáveis na etiologia multifatorial da obesidade e suas comorbidades. Além disso, os resultados podem gerar indicadores para serem usados em correlações entre fatores do comportamento que possam modular microbiota e imunidade, como perfil nutricional e hábitos de vida.

Para este estudo estão sendo convidados adultos obesos não diabéticos assistidos em um serviço de endocrinologia e indivíduos eutróficos recrutados na comunidade. Os participantes responderão a um questionário de dados clínicos e epidemiológicos, serão submetidos à avaliação antropométrica (peso atual, altura, Índice de Massa Corporal, circunferência da cintura, relação entre as circunferências da cintura e do quadril, circunferência do braço, circunferência muscular do braço e percentual de gordura corporal), avaliação nutricional, pela aplicação de um registro alimentar de 3 dias, e coleta de espécimes clínicos (sangue e fezes).

- Considerando-se os riscos envolvendo pesquisa com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente (resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), o estudo é classificado como de risco mínimo, isto é, o procedimento não acarretará riscos para os participantes, maiores do que aqueles aos quais eles estariam expostos na sua rotina.
- Eventuais desconfortos físicos ou emocionais serão minimizados, uma vez que os dados antropométricos serão obtidos durante consulta de endocrinologia e os espécimes clínicos serão coletados em domicílio (fezes no coletor fornecido) ou laboratório de análises clínicas participante do projeto (sangue), de acordo com a uma guia de convênio fornecida.
- Para participar deste estudo o Sr(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

- Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão e o (a) Sr(a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, Setor de Microbiologia** e a outra será fornecida ao senhor(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa **"MICROBIOTA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E OBESIDADE: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E EUTRÓFICOS"**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

CEP: 36036-900

FONE: (32) 2102- 3788 / E-MAIL: [cep.propesq@uff.edu.br](mailto:cep.propesq@uff.edu.br)

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. CLÁUDIO GALUPPO DINIZ**

**DEPTO. PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER, S/N - CAMPUS UNIVERSITÁRIO**

**BAIRRO SÃO PEDRO - CEP: 36036-330 - JUIZ DE FORA, MG**

**E-MAIL: [claudio.diniz@uff.edu.br](mailto:claudio.diniz@uff.edu.br)**

### 8.3 Anexo 3: Ficha de anamnese e dados cadastrais

#### FICHA DE ANAMNESE E DADOS CADASTRAIS

Entrevistador: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### DADOS PESSOAIS E SOCIÓ-DEMOGRÁFICOS

PRONTUÁRIO N°:

1. Nome:

2. Idade: 3. Sexo ( ) 4. Estado civil:

6. Endereço:

\_\_\_\_\_

—

\_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

7. Telefone:

Residencial: \_\_\_\_\_ Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

—

8. Ocupação profissional atual:

\_\_\_\_\_

9. Renda mensal da família (salários mínimo): \_\_\_\_\_ 10. N° de pessoas que vivem desta renda: \_\_\_\_\_

11. Escolaridade:

( ) Ensino Fundamental completo ( ) Ensino Fundamental Incompleto ( ) Ensino

Médio Completo

( ) Ensino Médio Incompleto ( ) Superior Completo ( ) Superior Incompleto

12. Cor: ( ) branca ( ) preta ( ) parda ( ) amarela ( ) outra

13 vida sexual ativa: ( ) não ( ) sim- parceiros ( ) 01 ( ) mais de um

16. Atualmente você tem:

a. Diabetes ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe

b. Doenças do coração ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe

c. Pressão alta ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe

- d. Insuficiência Renal ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- e. Doença no fígado ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- f. Depressão ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- g. Doença na tireóide ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- h. imunossupressão ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- i. soropositivo(a) para HIV ( 0 ) Não ( 1 ) Sim ( 7 ) Não sabe
- j. Outras doenças: \_\_\_\_\_

17. Você faz uso de medicamento ou de suplemento?

( 0 ) Não

(1) Sim –Qual (is)? (1) Anti-hipertensivo.

( 2 ) Hipoglicemiante oral.

( 3 ) Insulina.

( 4 ) Anti-depressivo.

( 5 ) Dislipidêmicos.

( 6 ) Antibióticos :

( ) antifúngico ( ) antibacteriano ( ) Antiprotozoário

Quanto tempo faz que tomou antibiótico por último?

( ) menos de 30 dias ( ) 30 dias ou mais

( 7 ) Outro (s). Qual (is)?

---

#### DADOS SOBRE ESTILO DE VIDA

1. Você pratica alguma atividade física?

(0) Não (1) Sim. Se SIM, qual

atividade? \_\_\_\_\_

Com que frequência? \_\_\_\_\_vezes/semana. Quanto tempo gasta praticando atividade física? \_\_\_\_\_horas

2. Em média, quanto tempo por dia você gasta assistindo TV ou fica no computador? \_\_\_\_\_ horas.

3. Você fuma?

(0) Não (1) Sim. Se sim, há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Quantos cigarros fuma por dia?

\_\_\_\_\_

4. Você costuma consumir bebida alcoólica?

( 0 ) nunca

( 1 ) diariamente

( 2 ) 1 ou menos de uma vez por mês

( 3 ) pelo menos 1 vez por semana

( 4 ) 2 a 4 vezes por mês

( 5 ) 2 a 3 vezes por semana

5. Qual o tipo de bebida você bebe?

( 0 ) Nenhuma ( 1 ) cerveja ( 2 ) vinhos ( 3 ) destilados (cachaça, whisky, vodca, licor) (

4 ) bebidas ice

6. Quantas doses contendo álcool você consome num dia típico quando você está bebendo?

( 0 ) Nenhuma ( 1 ) 1 a 2 doses ( 2 ) 3 a 5 doses ( 3 ) 6 a 8 doses ( 4 ) 10 ou mais

## 8.4 Anexo 4. Questionário quantitativo de frequência alimentar

Leite e derivados	Quantas vezes você come	Unidade	Pequena	Média	Grande
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Iogurte convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Iogurte light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Queijo branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Queijo amarelo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Requeijão convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Requeijão light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Pães e substitutos</b>					
Pão francês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pão de forma convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pão de forma Light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pão integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pão de queijo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito salgado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito polvilho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito de maisena	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito recheado diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito recheado convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito Waffer diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Biscoito Waffer convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Bolo diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

Bolo convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Gorduras</b>					
Margarina convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Margarina Light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Maionese convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Maionese light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Azeite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Cereais</b>					
Arroz	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Arroz integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Arroz temperado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Batata Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Mandioca Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Batata cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Mandioca cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Angu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Milho Verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Macarrão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Lasanha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Macarrão instantâneo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Coxinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Quibe	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Esfiha/ enroladinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

Cereais	Quantas vezes você come	Unidade	Pequena	Média	Grande
Empada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pastel	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Farinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Farofa	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Frutas</b>					
Laranja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Maçã	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Melancia/ melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Uva	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Outras frutas _____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Suco de outras frutas _____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Leguminosas</b>					
Feijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

Feijão tropeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
<b>Verduras/ legumes</b>					
Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Agrião	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Couve	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Couve flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cenoura crua	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cenoura cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Abóbora cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Chuchu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Quiabo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pepino	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Sopas_____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			