

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

**Thaís Oliveira de Paula**

**DIVERSIDADE BACTERIANA INTESTINAL E PARÂMETROS  
NUTRICIONAIS DE INDIVÍDUOS OBESOS, COM SOBREPESO  
E EUTRÓFICOS.**

**Juiz de Fora**

**2016**

**THAÍS OLIVEIRA DE PAULA**

**Diversidade bacteriana intestinal e parâmetros  
nutricionais de indivíduos obesos, com sobrepeso e  
eutróficos**

Dissertação de Mestrado do Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciências Biológicas na  
área de Imunologia/DIP.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galupo Diniz**

**Co-orientadores: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva**

**Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar**

**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**

Profa. Dra. Aline Dias Paiva

Dr<sup>a</sup>. Juliana Alves Resende

Dr<sup>a</sup>. Alessandra Barbosa Ferreira Machado

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Boroni Moreira

Profa. Dr<sup>a</sup> Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

Departamento Nutrição

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

## RESUMO

A obesidade nos dias atuais é considerada uma pandemia, acometendo pessoas de todas as idades, sexo e raça. É uma doença que cursa com um estado inflamatório crônico de baixo grau, de causa multifatorial, associada a complicações metabólicas de alta morbimortalidade que geram elevados custos ao sistema de saúde. A microbiota intestinal possui grande importância no desenvolvimento da função intestinal. Estudos recentes têm associados à microbiota intestinal humana ao desenvolvimento e manutenção da obesidade envolvendo vários mecanismos distintos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade bacteriana no ecossistema intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos e correlacionar o perfil microbiano com o perfil nutricional e bioquímico destes pacientes. Foram avaliados 72 indivíduos classificados em eutróficos (n=24), com sobrepeso (n=24) e obesos (n=24), de acordo com o IMC. Medidas antropométricas, avaliação sociodemográfica e nutricional dos pacientes foram realizadas. Dos 72 indivíduos amostrados 63,9% pertence ao sexo feminino e 36,1% ao masculino, com uma média de idade de 39,6 anos, representativo de indivíduos adultos. A densidade de diferentes grupos bacterianos foi avaliada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e análises de *fingerprint* foram realizadas pelo método de PCR-Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) utilizando os iniciadores para o domínio Bactéria. Os resultados da FISH mostraram uma densidade relativa menor no grupo de obesos, comparado aos eutróficos, na maioria dos grupos bacterianos estudados, porém a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* encontra-se aumentada nos obesos em relação aos eutróficos. A MIH dos indivíduos com sobrepeso mostrou estar em um processo de transição, indo ao encontro à microbiota de pessoas obesas. A análise de PCR-DGGE mostrou uma maior similaridade da MIH entre os grupos com sobrepeso e obeso. Indivíduos do mesmo grupo tenderam a se agrupar mais próximo, mesmo em *clusters* diferentes. As análises de correlação (*spearman*) entre os grupos bacterianos e parâmetros bioquímicos e antropométricos dos indivíduos mostrou uma correlação negativa moderada entre colesterol total e colesterol LDL e alguns grupos bacterianos, porém essa correlação só foi percebida no grupo de eutróficos, sugerindo que a MIH se comporta de maneira diferente dependendo do tipo de ambiente intestinal. A análise de correlação (odds ratio) entre razão *Firmicutes/Bacteroidetes* alterada (razão >1), com os índices IMC (>25), glicose (>100 mg/dL) e colesterol séricos (>200 mg/dL) mostraram uma correlação positiva, sugerindo que esses fatores que estão fortemente associados ao processo de obesidade, podem afetar a composição da MIH, de maneira a propiciar um ambiente que privilegie um aumento de *Firmicutes*.

**Palavras chaves:** Obesidade; Microbiota intestinal; Parâmetros nutricionais.

## ABSTRACT

Nowadays obesity is considered a pandemic, affecting people of all ages, gender and ethnicity. It is a chronic disease that leads to a chronic low-grade inflammatory state, with multifactorial cause, associated with metabolic complications with high morbimortality which generates high costs to the health care system. There is a great importance related to the gut microbiota and its functional development. Recent studies have associated gut microbiota to obesity development and maintenance, involving different mechanisms. This study objective was to evaluate the bacterial diversity in gut ecosystem between obese, overweight and eutrophic people, besides correlating microbial profile and nutritional-biochemical profile in each patient. 72 patients have been evaluated and classified as eutrophic (n=24), overweight (n=24) or obese (n=24) according to BMI. Anthropometric measurements, socio-demographic and nutritional evaluation have been carried out. . From these 72 patients 63% are female and 36,1% male, with a mean age of 39,61 years, representative of adults individuals. The density of different bacterial groups has been evaluated using Fluorescence in situ hybridization (FISH) and Fingerprint Analyze have been made with PCR- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) using initiators to the domain Bacteria. Though the results from FISH showed that the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* is greater in obese than eutrophics, they showed a reduced relative density in obese. The overweight's gut microbiota is still at the process of transition to meet obese people's microbiota. PCR-DGGE Analysis showed more similarity of Human Gut Microbiota(HGM) between the groups with overweight and obese, and who is in the same group tends to group together next to, even on different clusters. Correlation analysis (spearman) between bacterial groups and Anthropometric-Biochemical from these individuals showed a moderate negative correlation between total cholesterol and LDL-cholesterol and some bacterial groups, but this correlation was just realized in eutrophic group, suggesting the HGM behaves in a different way according to intestinal environment. Correlation analysis (odds ratio) between ratio *Firmicutes / Bacteroidetes* changed (ratio>1), with the BMI index (>25), glucose (>100 mg/dL) and serum cholesterol (>200 mg/dL) showed a positive correlation suggesting that these factors, which are related with the obese process, can affect the composition of Human Gut Microbiota, increasing positively *Firmicutis*.

**Key Words:** Obesity; Intestinal microbiota; nutritional parameters

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sondas, táxons, sequências e concentração de formamida utilizadas nos experimentos de FISH. ....	49
Tabela 2. Sexo e idade dos participantes do estudo. ....	54
Tabela 3. Características epidemiológicas dos participantes do estudo .....	55
Tabela 4. Características clínicas e comportamentais dos participantes do estudo. ....	57
Tabela 5. Dados laboratoriais dos participantes do estudo. ....	58
Tabela 6. Características antropométricas dos participantes do estudo. ....	59
Tabela 7. Média absoluta e relativa da fração de ingestão energética total pelos participantes do estudo, por grupos de alimentos e valores de $p$ . ....	63
Tabela 8. Estatística descritiva dos resultados da variável riqueza para o domínio bactéria e valores de $p$ entre os grupos estudados. ....	67
Tabela 9. Correlação entre razão Firmicutes/Bacteroidetes >1 e variáveis fisiológicas, de comportamento e bioquímicas dos indivíduos participantes. ...	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação no número e composição dos microrganismos ao longo do TGI .....	23
Figura 2. Funções comuns e específicas atribuídas a cada enterotipo.....	29
Figura 3. Visão esquemática de como a MI promove o armazenamento de gordura.....	33
Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental .....	42
Figura 5. Média da ingesta calórica pelos indivíduos dos grupos do estudo....	61
Figura 6. Média da ingesta de grupos de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos do estudo.....	62
Figura 7. Densidade microbiana total nos grupos estudados.....	64
Figura 9. Densidade bacteriana relativa nos grupos estudados.....	66
Figura 10. DGGE fingerprint dos produtos de amplificação do DNA bacteriano correspondente à região V6 do gene codificador para o RNA 16s .....	68
Figura 11. Diagrama de Venn com a distribuição das bandas correspondentes à região V6 do RNA16s bacteriano .....	69
Figura 12. Agrupamento dos indivíduos participantes desse estudo de acordo com o perfil de bandas correspondentes à região V6 do RNA16s bacteriano amplificadas a partir do DNA metagenômico extraído de amostras fecais separadas por DGGE.....	70
Figura 13. Matriz de similaridade resultante da análise de agrupamento UPGMA com coeficiente de Jaccard, do <i>fingerprint</i> dos produtos de amplificação do DNA bacteriano, separados em DGGE, correspondente à região V6 do gene codificador para o RNA16s. ....	71

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACC – acetil-CoA Carboxilase
- AMDR- níveis aceitáveis de distribuição de macronutrientes do inglês *acceptable macronutrient distribution rangers*
- AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
- AMPK- proteína quinase ativada por AMP
- ATP- trifosfato de adenosina
- CA- Circunferência abdominal
- CB1/CB2- receptor canabinóide tipo 1 e 2
- CC- Circunferência da cintura
- ChREBP- proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato do inglês *carbohydrate responsive element binding protein*
- CQ- Circunferência do quadril
- DAPI- 4,6-diamedino-2-fenilindol
- DGGE- eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- DNA- ácido desoxirribonucleico
- DRI- ingestões dietéticas de referência do inglês *dietary reference intakes*
- eCB- endocanabinóide
- EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
- EER- necessidade estimada de energia
- FAS- ácido graxo sintetase
- Fiaf- fator adipocitário induzido pelo jejum do inglês *fasting-induce adipose factor*
- FISH- hibridização *in situ* fluorescente
- Gpr- proteína G
- HOMA- Modelo de avaliação da homeostase do inglês *homeostasis mode assessment*
- IL1- interleucina 1
- IL6- interleucina 6
- IL12- interleucina 12
- IL4- interleucina 4

IMC- índice de massa corporal  
LPL- lipoproteína  
LPS- lipopolissacarídeo  
MIH- microbiota intestinal humana  
MO- microrganismos  
MΦ- macrófago  
NaCl- cloreto de sódio  
OMS- organização mundial da saúde  
PA- pressão arterial  
PAI-1- inibidor ativador de plasminogênio 1  
PBS- Fosfato sódico dibásico  
PCR- reação em cadeia da polimerase  
PYY- hormônio peptídeo YY  
RCQ- relação cintura-quadril  
RNA- ácido ribonucleico  
RNAm- RNA mensageiro  
RNAr- RNA ribossômico  
RNA16s- RNA ribossômico 16s  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SREBP-1- proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol do inglês  
*sterol responsive element binding protein*  
TEMED- *N,N,N',N'*- tetrametiletileno diamino  
TGI- trato gastrointestinal  
Tris-HCL- hidroximetilaminometano-ácido clorídrico  
TRL- receptor do tipo toll  
TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral  $\alpha$   
Th1/Th2 – linfócitos do tipo T helper 1 e 2  
VET- valor energético total

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Obesidade: aspectos clínicos e epidemiológicos.....	17
2.2 Obesidade, inflamação e sistema imunológico .....	20
2.3 Microbiota intestinal .....	23
2.4 Microbioma bacteriano intestinal.....	26
2.5 Microbiota intestinal e obesidade.....	30
2.5.1 Mecanismos associados à MIH no desenvolvimento da obesidade .	31
2.5.1.1 Extração de energia a partir dos alimentos da dieta e armazenamento de gorduras .....	31
2.5.1.2 Atividade inflamatória e pró-inflamatória de espécies bacterianas associadas ao desenvolvimento da obesidade.....	34
2.5.1.3 Regulação da permeabilidade da barreira intestinal. ....	35
2.6 Métodos independentes de cultivo para estudo de comunidades microbianas.....	36
2.6.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) .....	37
2.6.2 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 Delineamento experimental .....	42
4.2 Seleção dos pacientes .....	43
4.3 Inquérito epidemiológico e avaliação nutricional.....	43
4.4 Análises bioquímicas .....	46
4.5 Coleta de amostras fecais e preparação para análises microbiológicas	46
4.6 Extração de DNA a partir dos espécimes fecais .....	47
4.7 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	48
4.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) .....	50
4.8.1 Amplificação de DNAr 16S de representantes do domínio Bacteria utilizando oligoiniciadores específicos .....	50
4.8.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante .....	51

4.9 Análise estatística .....	52
<b>5. RESULTADOS</b> .....	54
5.1 Características epidemiológicas e clínicas dos participantes.....	54
5.2. Consumo calórico, de macronutrientes e fibras. ....	60
Figura 5. Média da ingesta calórica pelos indivíduos dos grupos em	
5.3 Avaliação quantitativa da densidade bacteriana total e grupos bacterianos pela técnica de FISH.....	64
5.4 Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana intestinal. ....	67
5.5 Correlação da carga microbiana com dados bioquímicos e perfil nutricional e entre o aumento da razão <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> e características dos indivíduos. ....	72
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>APÊNDICE A-</b> Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo Eutrófico. ....	100
<b>APÊNDICE B-</b> Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo com <b>sobrepeso</b> .....	<b>101</b>
<b>APÊNDICE C-</b> Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo Obeso. ....	102
<b>APÊNDICE D-</b> Tabela de resultados de razão <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> por grupo de indivíduos. ....	103
<b>APÊNDICE E-</b> Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo eutrófico. ....	104
<b>APÊNDICE F-</b> Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo com sobrepeso. ....	105

<b>APÊNDICE G-</b> Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo Obeso. .....	106
<b>ANEXO A-</b> Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF .....	107
<b>ANEXO B-</b> Termo de consentimento livre e esclarecido.....	109
<b>ANEXO C</b> – Ficha de anamnese e dados cadastrais.....	111
<b>ANEXO D</b> – Questionário quantitativo de frequência alimentar. ....	114
<b>ANEXO E</b> – Ficha para dados antropométricos.....	118
<b>ANEXO F-</b> Classificação de alimentos com base no processamento industrial. .....	119

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz, pela confiança e ensinamentos.

Agradeço às minhas co-orientadoras, Vânia Lúcia da Silva e Dionéia Evangelista César.

Agradeço às professoras do departamento de nutrição Sheila e Ana Paula e às pós-doutoras do laboratório de bacteriologia, Alessandra e Juliana, por toda ajuda prestada.

Agradeço à Francis e Marjorie pela parceria.

Agradeço aos alunos Douglas e Bruna. Sorte a minha poder contar com Alunos tão competentes.

Agradeço também aos meus amigos e familiares por todo apoio.

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A obesidade configura-se atualmente como um sério problema de saúde pública, sendo considerada uma pandemia, atingindo tanto países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Essa patologia, de etiologia multifatorial, está fortemente relacionada com o desenvolvimento de co-morbidades, tais como: diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer, além de outras doenças. Assim, há grande necessidade de estudos prospectivos que tenham como objetivos a contribuição com conhecimentos sobre as causas multifatoriais da obesidade e suas implicações para o prognóstico dos pacientes.

Vários destes estudos têm sugerido uma relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal. Entretanto, esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos, que pode refletir na qualidade microbiana endógena. Além disso, observa-se grande variação metodológica nestes estudos e com universo amostral baixo e desigual, o que gera em resultados não homogêneos, somando-se o viés metodológico às variações regionais e sociais dos indivíduos.

Nesta direção, a literatura já sugere emprego de metodologias mais estruturadas, com a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e índice de massa corporal (IMC) na caracterização da doença. Desta forma, a inclusão de dados sócio-demográficos, clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores endógenos dos hospedeiros, como características microbiológicas e bioquímicas e de comportamento, são sugeridos.

Acredita-se que a composição bacteriana (espécies e abundância) da microbiota intestinal é única para cada indivíduo, embora a noção de microbiota residente associada às diferentes superfícies anatômicas nas diferentes espécies ainda seja aceita. Assim, alguns autores propõem o conceito de um núcleo microbiano comum entre os diferentes hospedeiros, entretanto, esta

proposição tem sido questionada, visto que espécies de núcleo anteriormente proposto podem representar menos de 1% do total de componentes da microbiota intestinal em alguns indivíduos semelhantes.

Contudo, apesar da grande variabilidade na composição de espécies (microbiota), os perfis genéticos funcionais (microbiomas) são semelhantes em indivíduos saudáveis. No entanto, essa redundância funcional pode refletir convergência evolutiva de táxons não relacionados, culminando em dificuldades na compreensão do que constitui a variação saudável ou patológica na estrutura da comunidade microbiana.

Assim, considerando-se a carência ou inexistência de estudos semelhantes no Brasil, além das fragilidades técnicas e metodológicas destacadas na literatura internacional e a real extensão do fenômeno considerando-se indivíduos de composições culturais diferentes, esse estudo foi proposto fomentando uma linha de pesquisa abrangente (caracterização fisiológica, molecular e epidemiológica de bactérias e fungos clinicamente relevantes) que busca estudar, além de outros aspectos da biologia bacteriana, a diversidade microbiana associada a diferentes ecossistemas humanos. Pretende-se contribuir com informação científica sobre a associação das características sociais e de comportamento. clínicas e nutricionais com a diversidade microbiana no trato gastrointestinal, de maneira comparativa entre indivíduos obesos, sobrepeso e eutróficos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade: aspectos clínicos e epidemiológicos.

A obesidade é uma doença crônica, de caráter mundial, de alta prevalência e incidência crescente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Acomete todas as raças, faixas etárias, sem distinção entre os sexos, podendo ser considerada nos dias atuais uma pandemia (FRANCISCHI et al., 2000; BORGES, 2011; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011; BAHIA et al, 2012). Caracteriza-se pelo armazenamento excessivo de gordura no tecido adiposo, como consequência de um desequilíbrio no consumo, gasto e armazenamento de energia. Como o estado de desnutrição representa um perigo maior, nossos sistemas biológicos são voltados para proteger o organismo contra uma perda excessiva de energia, mais do que um ganho excessivo, sendo mais fácil, dessa forma ganhar peso do que perdê-lo. O excesso de energia é armazenado no organismo preferencialmente na forma de gordura, que é muito mais densa energeticamente que os carboidratos e não exige grande quantidade de água (SPEAKMAN, 2004; DIBAISE et al., 2008).

O diagnóstico mais comum da obesidade é adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à sua simplicidade e baixo custo, é feito através do índice de massa corporal (IMC), que considera a razão entre o peso do indivíduo e altura ao quadrado ( $\text{Kg/m}^2$ ). O IMC compara-se bem com o índice de gordura corporal medidos por aparelhos de tecnologia mais avançada, principalmente quando combinado com a medida da circunferência da cintura, que não deve ser maior que 94 centímetros (cm) no homem e 80 cm na mulher (PI-SUNYER et al., 1998; SPEAKMAN, 2004). De acordo com o IMC, os indivíduos são classificados em: (i) abaixo do peso,  $\text{IMC} < 18,5 \text{ Kg/m}^2$ ; (ii) normal,  $\text{IMC}$  entre 18,5 e 24,9  $\text{Kg/m}^2$ ; (iii) sobrepeso,  $\text{IMC}$  entre 25 e 29,9  $\text{Kg/m}^2$ ; (iv) obesidade grau I,  $\text{IMC}$  entre 30 e 34,9  $\text{Kg/m}^2$ ; (v) obesidade grau II,  $\text{IMC}$  entre 35,0 e 39,9  $\text{Kg/m}^2$ ; (vi) obesidade grau III,  $\text{IMC} > 40 \text{ Kg/m}^2$  (WHO, 2000).

Sabe-se que a causa da obesidade é multifatorial, estando implicados fatores genéticos, ambientais, sociais, psicológicos e culturais. Estes fatores interagem e atuam sobre mediadores fisiológicos de gasto e armazenamento de energia, resultando no fenótipo obeso (PI-SUNYER et al., 1998; FRANCISCHI et al., 2000).

Pessoas com sobrepeso e obesidade apresentam risco aumentado em desenvolver certas doenças crônicas, algumas com alto risco de complicações e índice de mortalidade associado (PI-SUNYER et al., 1998). Suas complicações e implicações metabólicas são consideradas os principais desafios a serem combatidos no século XXI, devido ao seu aumento crescente e por estar entre as principais causas de morte passíveis de prevenção (SEIDELI, 2000; PRENTICE, 2006; TILG e MOSCHEN, 2006).

Estudos recentes apontam a obesidade como fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, principalmente devido à hiperglicemia típica da obesidade, ação de adipocinas e pelo risco associado a doenças vasculares, além de estar associada também com o desenvolvimento de algumas doenças, como o diabetes, doenças cardíacas, hipertensão e alguns tipos câncer (Quadro 1) (BALISTRERI, CARUSO e CANDORE, 2010).

O aparecimento de determinada doença e o risco associado a ela, no obeso, está condicionada não apenas ao excesso de peso, mas também à localização da gordura (WHO 2000; TILG e MOSCHEN, 2006; BAHIA et al, 2012). O acúmulo de gordura na região inferior ou quadril é chamada obesidade ginóide, já na região central ou abdominal é chamada obesidade andróide, sendo esta última vinculada a um maior risco relativo no desenvolvimento de co-morbidades (FRANCISCHI et al., 2000).

### Quadro 1 Principais co-morbidades associadas à obesidade

Cardiovasculares: hipertensão; doenças coronarianas; acidente vascular cerebral; veias varicosas; trombose venosa profunda.

Respiratórias: falta de ar; apnéia durante o sono; síndrome hipoventilação.

Gastrointestinais: hérnia de hiato, cálculo na vesícula biliar, cirrose e esteatose hepática, hemorroida, câncer colorectal.

Metabólica: hiperlipidemia, resistência à insulina, diabetes mellitus, síndrome do ovário policístico, hiperandrogenização, irregularidades menstruais.

Região peitoral: câncer de mama, ginecomastia.

Útero: câncer endometrial, câncer cervical.

Trato urinário: câncer de próstata, incontinência urinária.

Pele: micoses, linfedemas, celulites.

Ortopédicas: osteoartrites, gota.

Endócrinas: redução no hormônio do crescimento (GH), redução na resposta à prolactina, respostas hiperdinâmicas do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ao hormônio liberador de ACTH (CRH), aumento do cortisol livre na urina, alterações nos hormônios sexuais.

Adaptado de FRANCISCHI et al., 2000.

O aumento do número de indivíduos obesos e, conseqüentemente, das doenças associadas à obesidade, possui um efeito substancialmente negativo na qualidade de vida e na longevidade, pois pode levar a uma redução de 5 a 20 anos na expectativa de vida, dependendo do grau de obesidade (FONTAINE e BAROFSKY, 2001). Dados originados da Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde, realizada nos Estados Unidos, mostraram que 33% da população adulta são obesos, e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (MOKDAD ET AL., 2003; OGDEN, CARROLL e FLEGAL, 2008). Este aumento da obesidade entre os mais jovens é um fato preocupante, uma vez que eles apresentarão riscos associados à obesidade durante um longo período de suas vidas (CABALLERO, 2007). No Brasil, 52,5% da população

está acima do peso e 17,9% está obesa, sendo a obesidade detectada principalmente em mulheres de baixa renda (KAIN et al, 2014; VIGITEL, 2014). O aumento nos casos de obesidade no país está associado, principalmente, às mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas ocorridas ao longo dos últimos anos, o que gerou uma diminuição da desnutrição e aumento da obesidade na população, de uma maneira geral (FRANCISCHI et al., 2000).

Assim como a restrição calórica, a obesidade tem sido considerada como um estado de má nutrição. Indivíduos obesos carecem de vitaminas e sais minerais essenciais para o bom funcionamento do organismo (SCHAIBLE e KAUFMANN, 2007). A avaliação das consequências para a saúde dos indivíduos obesos e com sobrepeso ainda é difícil, porém existe uma correlação positiva entre o risco de mortalidade, IMC, pressão arterial e colesterol. Pacientes fumantes e que consomem grande quantidade de álcool estão sujeitos a um maior risco de complicações (PI-SUNYER et al., 1998; FRANCISCHI et al., 2000 WHO, 2000).

Estima-se que de 2 a 6% dos gastos com a saúde no mundo são devidos às doenças relacionadas à obesidade. Segundo Rtveldze et al. (2013), o número de casos irá dobrar até 2050 no Brasil, e como consequência o custo com a obesidade e doenças relacionadas aumentará substancialmente (SWINBURN et al., 2011; RTVELADZE et al., 2013).

Estudos realizado por Bahia et al. (2012) estimaram que, durante os anos de 2008 a 2010, os gastos com todas as doenças associadas ao sobrepeso e obesidade foram de US\$ 2.152.102.171 por ano no Brasil, sendo que os maiores gastos são com doenças cardiovasculares, seguida de neoplasias, asma, diabetes melitus e osteoartrite (TRAYHURN, 2013).

## **2.2 Obesidade, inflamação e sistema imunológico**

Recentes estudos têm sugerido que a obesidade é um estado de inflamação crônica de baixo grau, que contribui para a resistência à insulina e conseqüentemente para o desenvolvimento da diabetes tipo-2 (BOSELLO e ZAMBONI, 2000; HERDER et al., 2013). Esta inflamação está associada a uma

produção de citocinas inflamatórias, maior ativação das vias de sinalização inflamatórias e aumento de reagentes de fase aguda (WELLEN e HOSTAMISLIGIL, 2003). Adicionalmente, o estado calórico crônico observado na obesidade está diretamente relacionado com alterações em fatores metabólicos, que tem impacto direto sobre o sistema imunológico (SIEGMUND et al., 2002).

Devido a esta inflamação crônica de baixo grau, indivíduos obesos possuem maiores níveis de citocinas inflamatórias circulantes, tais como: leptina, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein-1*) que por sua vez é responsável por uma atração de monócitos para o tecido adiposo (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2003). O aumento de leptina circulante e a resistência central a este hormônio, associado ao decréscimo nos níveis de grelina e adiponectina estão correlacionados com a manutenção da inflamação (MANCO et al., 2007; SMITH et al., 2007; VALERA MORA , 2007; ZHANG et al., 2009).

O tecido adiposo dos obesos se torna um sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos (M $\Phi$ ) 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).

É bem documentado que os M $\Phi$  residentes em diversos órgãos possuem fenótipo, morfologia e funções diferentes. Os M $\Phi$  associados ao tecido adiposo são as células mais bem estudadas no microambiente adiposo e em indivíduos obesos, constituem de 40 a 50% do total de células e são os principais produtores de citocinas pró-inflamatórias (WEISBERG et al., 2003). Os M $\Phi$  representam uma população celular bastante heterogênea. São ativados por vários estímulos, que os induzem a expressar padrões distintos de marcadores de superfície celular (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007).

A hiperplasia e hipertrofia típicas do tecido adiposo de obesos leva a uma infiltração dos macrófagos neste tecido, e é consequência de alguns processos definidos, tais como: morte dos adipócitos; hipóxia do tecido;

secreção aumentada de quimiocinas e desregulação no fluxo de ácidos graxos (SUN, KUSMINSKI e SCHERER, 2011).

Segundo Lumeng, Bodzin e Saltiel (2007), em pessoas obesas ocorre uma mudança no estado polarizado dos MΦ, de uma forma M2, antiinflamatória, que se acumula em uma condição de balanço energético negativo, para a forma M1 pró-inflamatória. Duas vias principais de ativação de MΦ são descritas: MΦ M1, são ativados pela via clássica, respondem a sinalização via receptores do tipo Toll (TRL) e produzem grandes quantidades de IL-12, TNF-α, IL-1β e IL-6 e geram radicais livres como resultado do *burst* oxidativo. Por sua vez MΦ M2 são alternativamente ativados, respondendo a citocinas Th2, como IL-4 e IL-13. A população M1 demonstra uma correlação positiva com a resistência à insulina, e predomina em estados de hipernutrição (HOTAMISLIGIL, 2006; BALISTRERI, CARUSO e CANDORE, 2010; SUN, KUSMINSKI e SCHERER, 2011).

Além dos MΦ, receptores do tipo TLR4 e TLR2 são expressos em adipócitos, pré-adipócitos e células endoteliais. Esses receptores participam do processo inflamatório relacionado à obesidade (BALISTRERI, CARUSO e CANDORE, 2010).

Pessoas obesas podem apresentar níveis alterados de leptina, hormônio relacionado com a saciedade, mas também descrito como importante indutor de respostas inflamatórias do tipo Th1 (TILG e MOSCHEN, 2006).

Nas últimas décadas, principalmente depois da descoberta da leptina, o tecido adiposo passou a ser visto como um órgão endócrino, capaz de secretar uma variedade de moléculas, que encontram receptores em diversas células do sistema imunológico. Desta forma, a expansão deste tecido, observada na obesidade parece ter fortes impactos na resposta imune (TILG e MOSCHEN, 2006). Diferentes células do sistema imune fazem parte do tecido adiposo, como MΦ e linfócitos T CD4+ e TCD8+ (HOTAMISLIGIL, 2006).

## 2.3 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana (MIH) é constituída por uma grande quantidade de microrganismos, em torno  $10^{14}$  bactérias e arqueias por grama de conteúdo luminal, além de fungos, vírus e protozoários. As bactérias pertencem, provavelmente, a mais de 1800 gêneros e de 15000 a 36000 espécies, distribuídas de maneira não homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal (figura 1).

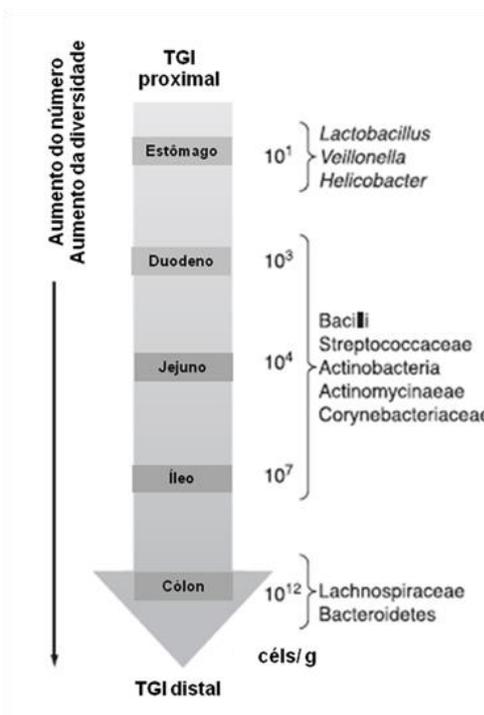


Figura 1. Variação no número e composição dos microrganismos ao longo do trato gastro intestinal. Fonte: SEKIROV et al. (2010).

No estômago e intestino delgado, a massa microbiana total é mantida baixa, principalmente devido ao pH ácido, grande quantidade de sais biliares e secreção de imunoglobulinas do tipo IgA. Esse controle é importante, pois uma quantidade muito elevada de bactérias nesses locais poderia interferir na absorção adequada de alguns nutrientes (VILLELA et al., 2004; MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; WALTER e LEY, 2011).

O intestino grosso, principalmente o colón, é a parte que alberga o maior número de microrganismos, devido à grande quantidade de nutrientes ali disponíveis, ausência de secreções intestinais, ao peristaltismo lento característico do local e menor presença de placas de Peyer (VILLELA et al., 2004; MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; WALTER e LEY, 2011)..

Anaeróbios estritos dominam a composição da MIH em uma ordem de magnitude até três vezes superior aos aeróbios facultativos e anaeróbios. (LAGE e BRITO, 2012) Embora tenha sido descrito 50 filos componentes da microbiota colônica, dois deles são dominantes: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, representando 92,6% do total. Outros filos, tais como *Actinobactéria*, *Proteobactéria* e *Verrucomicrobia*, estão presentes em números variáveis (Quadro 2) (BRANDT, SAMPAIO e MIUKI, 2006; MORALES, BRIGNARDELL e GOTTELAND, 2010; TAGLIABUE e ELLI, 2013). Arqueias metanogênicas, principalmente *Methanobrevibacter smithii* também compõem a MIH (KORECKA e ARELAMPALAM, 2012)

<b>Quadro 2. Principais filos e gêneros encontrados na microbiota intestinal humana.</b>		
<b>Divisão</b>	<b>Filo</b>	<b>Gêneros Representativos</b>
Bactéria	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Peptoestreptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>Escherichia</i> <i>Helicobacter</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Archea	<i>Euryarcheota</i>	<i>Methanobrevibacter</i>

Adaptado de DIBAIS et al, 2008

Já é bem estabelecida a importância da microbiota entérica no desenvolvimento e função do intestino. A enorme quantidade e diversidade de microrganismos (MO) presentes no trato gastrointestinal (TGI) contribuem com diversas funções, tais como: função imunomoduladora, contribuindo para a maturação local e sistêmica de resposta imunológica e geração de uma imunotolerância; metabolismo de drogas; favorecimento do desenvolvimento de microvilosidades; importantes funções metabólicas, além de atuar como uma barreira para o desenvolvimento de patógenos, através da competição por nutrientes, fixação ao epitélio intestinal e produção de substâncias antimicrobianas (VILLELA et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2006; CANI e DELZENNE, 2007; DIBASE et al., 2008; TILG, MOSCHEN e KASER, 2009; SEKIROV et al., 2010; TAGLIABUE e ELLI, 2013). A disbiose da MIH pode levar ao acometimento de vários distúrbios como: diabetes tipo 1 e 2, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, câncer colorretal dentre outros (XU et al., 2012).

Diferenças na composição da microbiota de crianças, adultos e idosos estão bem relatadas, assim como a diferença entre os sexos e etnias, refletindo, dessa forma, as influências genéticas e as ambientais (DAVE et al., 2012). Acreditava-se que no útero os fetos seriam estéreis, mudando sua condição logo ao nascer, porém estudos recentes demonstraram que a placenta abriga um microbioma restrito, porém, metabolicamente rico, composto principalmente pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* (AAGAARD et al., 2014).

A forma de nascimento influi na composição da comunidade microbiana intestinal nos primeiros meses de vida. Bebês que nascem de parto normal desenvolvem uma microbiota semelhante à encontrada no ambiente vaginal da mãe, constituída principalmente por *Lactobacillus* e *Prevotella*. Já os que nascem de cesária, desenvolvem uma microbiota inicial parecida com a da pele, composta principalmente por *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, e também do ambiente hospitalar (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ et al., 2015). Durante a primeira infância a microbiota é instável e sua

composição dependente do tipo de alimentação, estado de saúde e uso de antibióticos. Há evidências, também, de que fatores genéticos estejam relacionados à seleção inicial dos microrganismos componentes da microbiota. O genótipo pode determinar o padrão de colonização, por exemplo, através da qualidade e quantidade dos sítios de adesão presentes na mucosa intestinal. (SEKIROV et al., 2010; CLEMENTE et al., 2012 DAVE et al., 2012). Aos três anos de idade a MIH se estabiliza indo de encontro ao perfil de um adulto, modificando-se novamente no idoso (DORÉ e BLOTTIÈRE, 2015).

As bactérias que iniciam a colonização do TGI são geralmente aerotolerantes, uma vez que inicialmente o intestino contém oxigênio, ou seja, possui um potencial de óxido-redução positivo, sendo substituída rapidamente por anaeróbios, predominantes no adulto (PENDERS et al., 2006; CLEMENTE et al., 2012).

A alimentação, o ambiente, o estado de saúde e o uso de antimicrobianos na infância são outros fatores determinantes da composição inicial da comunidade microbiana no intestino. Do ponto de vista evolutivo, o caráter microbiano do intestino depende da principal fonte nutricional, separando os perfis bacterianos de onívoros, herbívoros e carnívoros (SEKIROV et al., 2010; KORECKA e ARELAMPALAM, 2012).

Ao longo da vida, a dieta passa a ter um impacto direto na composição da MIH, afetando as proporções e tipos de metabolitos produzidos. Estudo desenvolvido por Wu et al. (2011) apontou que uma dieta rica em gorduras saturadas está associada a uma prevalência de *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, enquanto uma dieta rica em carboidratos e açúcares simples a uma prevalência de *Firmicutes* e *Proteobacteria*.

## **2.4 Microbioma bacteriano intestinal**

O conjunto de genes expressos pelas bactérias intestinais é conhecido como microbioma. Estima-se que a microbiota intestinal contenha cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (FLINT, 2011). Os genes do

hospedeiro juntamente com os genes expressos por todas as bactérias que o colonizam formam o metagenoma humano (TURNBAUGH e GORDON, 2009; CANI e DELZENNE, 2007).

O microbioma é responsável por reações metabólicas que o organismo do hospedeiro não é capaz sozinho, como exemplo: degradação de componentes da dieta que não somos capazes de digerir; fermentação de polissacarídeos, com formação de ácidos graxos de cadeia curta; e a regulação de genes do hospedeiro que promovem a deposição de lipídeos nos adipócitos (TURNBAUGH et al., 2006; WALTER e LEY, 2011; CLEMENTE et al., 2012).

Ao hospedar uma MIH rica em genes relacionados a enzimas que atuam na digestão de carboidratos, tais como glicosídeo hidrolases, carboidratos esterases, glicosil transferases, e polissacarídeo liases, os mamíferos eliminam a necessidade de evoluir complexos enzimáticos que são necessários à quebra de vários polissacarídeos da dieta, dessa forma, a MIH atua de maneira benéfica ao hospedeiro (DEVARAJ, HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013).

A ingestão, por exemplo, de grande quantidade de amido, pode ultrapassar a capacidade enzimática da amilase. O amido em excesso é então degradado por bactérias do intestino. Genes que irão produzir a enzima amilase são encontrados em bactérias filogeneticamente distintas tais como: *Butyrivibrio*, *Roseburia* e *Bacteroides*. Portanto, um aumento da quantidade de amido na dieta pode fazer com que o número dessas bactérias na comunidade aumente, assim, a dieta pode atuar diretamente na modulação do microbioma intestinal (WALTER e LEY, 2011).

Apesar da variabilidade interpessoal na composição da massa microbiana intestinal, o microbioma é funcionalmente equivalente na maioria dos seres humanos. Qin et al (2010) avaliaram a existência de um núcleo microbiano comum entre a maioria dos seres humanos, e sugeriram que cada hospedeiro transporta cerca de 500.000 genes codificados por bactérias, sendo aproximadamente 40% encontrados em mais da metade dos pacientes. Estes genes altamente conservados estão relacionados, por exemplo, à degradação de açúcares complexos, produção de ácidos graxos de cadeia curta e biossíntese de vitaminas. Os autores descobriram ainda que a similaridade dos

genes era maior dentro de grupos de indivíduos da mesma família (QIN et al, 2010).

Já em relação aos genes envolvidos com a homeostase do ecossistema intestinal, os mais comuns estão ligados à digestão e posterior fermentação de açúcares complexo (KORECKA e ARELAMPALAM, 2012). Qin et al (2010) concluíram em seu trabalho que esses genes são expressos também pelas espécies menos abundantes, o que sugere que mesmo em quantidades reduzidas, ainda assim, essas bactérias são essenciais ao bom funcionamento intestinal.

Arumugam et al (2011) propuseram um novo conceito na classificação do microbioma intestinal. Este trabalho combinou dados metagenômicos de amostras fecais de diferentes estudos (33 amostras de pacientes de seis nacionalidades diferentes). Os autores propuseram que, apesar da grande diversidade e dinâmica da comunidade microbiana intestinal, a combinação desses microrganismos em cada indivíduo parecia ser sistematicamente organizada em *clusters*, que foram denominados de enterotipos. As funções comuns e específicas de cada enterotipo podem influenciar na resposta do hospedeiro (figura 2).

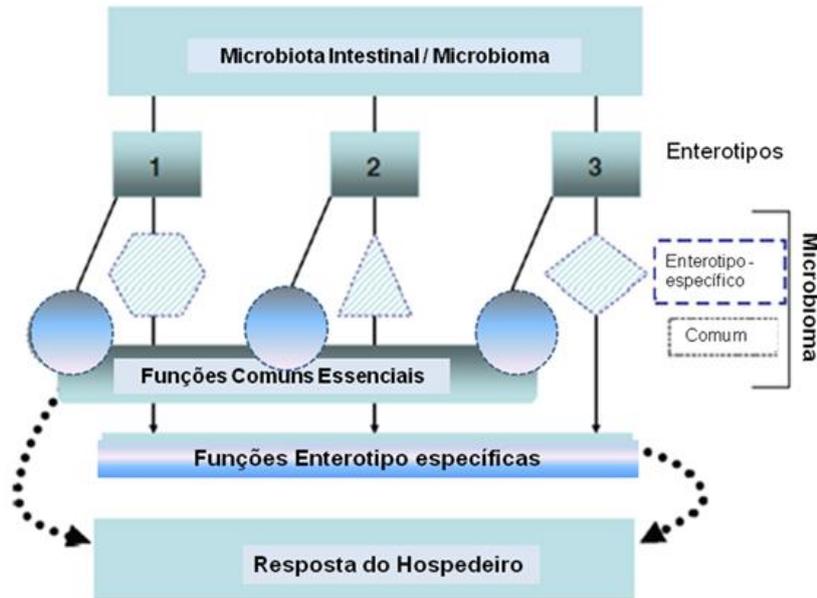


Figura 2: Funções comuns (círculo) e específicas (hexágono, triângulo e losango) atribuídas a cada enterotipo. Ambas as funções podem impactar coletivamente nas respostas do hospedeiro. Fonte: KORECKA e ARELAMPALAM (2012).

Cada enterotipo é identificado pelo domínio na quantidade de um dos três gêneros: *Bacteroides* (enterotipo 1); *Prevotella* (enterotipo 2); *Ruminococcus* (enterotipo 3). Eles abrigam tanto funções essenciais comuns e funções específicas. O enterotipo 1 produz energia principalmente a partir da fermentação de açúcares e é rico em genes relacionados a síntese de biotina; o enterotipo 2 produz energia a partir da degradação de mucinas e é rico em genes relacionados a síntese de tiamina; o enterotipo 3 é rico em genes relacionados a biossíntese do heme (DAVE et al., 2012; KORECKA e ARELAMPALAM, 2012; 65).

Os autores constataram ainda que os enterotipos não estão relacionados com traços fenotípicos do hospedeiro como sexo, idade e IMC, e são resistentes às mudanças temporárias na dieta (SCHWIERTZ et al., 2010; KORECKA e ARELAMPALAM, 2012).

## 2.5 Microbiota intestinal e obesidade

O desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica é um processo complexo, que envolve fatores genéticos e ambientais e está associada com vias que ligam o metabolismo ao sistema imunológico e vice-versa (DAS, 2001). Vários estudos sobre as relações da MIH com a obesidade têm sugerido mudanças na composição e função metabólica intestinal em indivíduos obesos, onde a microbiota desses indivíduos poderia influenciar no ganho de peso e deposição de gordura, atuando na captação de nutrientes e produção de mais energia a partir da dieta (DUNCAN et al., 2008). Além disso, é sugerido ainda que a microbiota intestinal possa interferir, inclusive, com a regulação e expressão de genes do hospedeiro relacionados com o armazenamento e gasto energético (TURNBAUGH et al., 2006; DELZENNE e CANI, 2011).

As evidências iniciais da relação entre a obesidade e a microbiota surgiram há três décadas, quando a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica e o ganho de peso induzido por lesão no hipotálamo foram associados a mudanças na composição da MIH (DEVARAJ, HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013).

A maioria dos estudos indicam mudanças principalmente em nível de filo, mas já existem estudos que comprovam uma mudança em vários gêneros e espécies específicas, que podem desempenhar papéis importantes no metabolismo do hospedeiro (TAGLIABUE e ELLI, 2013).

Estudos em camundongos geneticamente modificados para o fenótipo obeso (ob/ob) demonstraram que esses animais apresentaram uma maior porcentagem de bactérias do filo *Firmicutes* e uma diminuição de bactérias do filo *Bacteroidetes*. O aumento de *Firmicutes* e a redução correspondente de *Bacteroidetes* foram associados a uma produção extra de energia de 150 kcal (FLINT, 2011; XU et al., 2012; DEVARAJ, HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013).

## 2.5.1 Mecanismos associados à MIH no desenvolvimento da obesidade

### 2.5.1.1 Extração de energia a partir dos alimentos da dieta e armazenamento de gorduras

Backhed et al (2004) realizaram um estudo comparando os níveis de gordura corporal de camundongos normais frente a ratos *germ-free*. Segundo os autores, os camundongos convencionais possuíam 40% mais gordura que os não convencionais, mesmo consumindo menor quantidade de alimento. Ao transplantar a microbiota dos animais convencionais para os *germ-free*, estes tiveram um aumento de 60% da gordura corporal em um período de duas semanas. Os resultados encontrados corroboram a hipótese de que a composição da MI afeta a extração de energia a partir dos alimentos da dieta.

Os mecanismos provavelmente envolvidos nesse ganho de gordura corporal são a produção e promoção da absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e glicose pelo epitélio intestinal a partir da fermentação de componentes não digeríveis, levando a um aumento da glicemia e, conseqüentemente, insulinemia, dois fatores chaves na regulação da lipogênese. A glicose e a insulina também são importantes no processo de lipogênese *de novo* no fígado, através da expressão de várias enzimas chaves como Acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS) e de suas proteínas mediadoras ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*) e da SREBP-1(*sterol responsive element binding protein*) (DIBAISE et al., 2008; CANI e DELZENNE, 2009 TSUKUMO et al., 2009; FARÍAS, SILVA e ROZOWSKI, 2011).

Os principais AGCC produzidos a partir da fermentação de alimentos não digeríveis são o butirato, propionato e acetato. Estes são facilmente absorvíveis, podem difundir passivamente ou serem recuperados através de transportadores do ácido monocarboxílico (DUNCAN et al., 2008; TILG, MOSCHEN e KASER, 2009; SHEN, OBIN e ZHAO, 2013). Estima-se que sejam responsáveis por 10% da energia total da dieta (FLINT, 2011).

O acetato é captado pelo fígado, onde serve como substrato para a gliconeogênese, síntese de colesterol e triglicerídes. O Propionato e o acetato

são ligantes fisiológicos de dois receptores acoplados a proteína G (Gpr): Gpr41 e Gpr43, expressos em diversas células (imunes, endócrinas e adiposas), ativando-os (MORALES, BRIGNARDELL e GOTTELAND, 2010). A ativação da Gpr43 contribui para a inibição da lipólise e diferenciação dos adipócitos, aumento da adipogênese, promovendo uma expansão do tecido adiposo em animais submetidos a uma dieta rica em gorduras (DELZENNE e CANI, 2011; TILG, MOSCHEN e KASER, 2009; SHEN, OBIN e ZHAO, 2013). A interação dos AGCC com os receptores Gpr induz, também, à secreção do hormônio peptídeo YY (PYY) envolvido com a redução da motilidade intestinal, permitindo, dessa forma, maior absorção de nutrientes no lúmen intestinal. A alteração no trânsito intestinal tem impacto significativo na recuperação total de energia da dieta (MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; ALFENAS, 2012; FLINT, 2011).

O consumo de energia em menos de 1% acima do gasto energético pode levar a um aumento de peso e complicações metabólicas em longo prazo e, desta forma, qualquer influência na ingestão de calorias e aproveitamento energético, contribui para o equilíbrio do peso corporal (CANI e DELZENNE, 2009).

A capacidade de fermentar carboidratos à AGCC varia entre as espécies bacterianas, de modo que a composição da MIH de um indivíduo influencia na maior ou menor captação de energia (TILG, MOSCHEN e KASER, 2009).

Schwartz et al (2010), em estudo envolvendo 30 voluntários magros, 35 sobrepesos e 33 obesos, comprovaram que a quantidade de AGCC varia bastante entre os três grupos, sendo quase 20% maior nos obesos em comparação aos eutróficos.

A geração de AGCC envolve adicionalmente as ações metabólicas das Archeas metanogênicas. Elas utilizam o hidrogênio gasoso gerado pela fermentação como fonte de elétrons para a redução do dióxido de carbono e posterior formação do gás metano. A metanogênese, dessa forma, aumenta a eficácia da fermentação bacteriana e conseqüentemente a formação de AGCC. Além do que, a presença de metano está associada a uma diminuição do trânsito intestinal (SHEN, OBIN e ZHAO, 2013).

A MIH também está implicada com a inibição seletiva do *fasting-induced adipose factor* (Fiaf), hormônio produzido pela mucosa intestinal, e que atua como inibidor circulante da lipoproteína lipase (LPL). A LPL é uma enzima reguladora importante na liberação de ácidos graxos a partir de triglicérides acumulados nas lipoproteínas, privilegiando, dessa forma, o acúmulo de triglicérides no adipócitos e diminuindo a lipólise (BACKHED et al, 2004; CANI e DELZENNE, 2009; MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; FARÍAS, SILVA e ROZOWSKI, 2011; FLINT, 2011; ALFENAS, 2012; TAGLIABUE e ELLI, 2013) (figura 3).

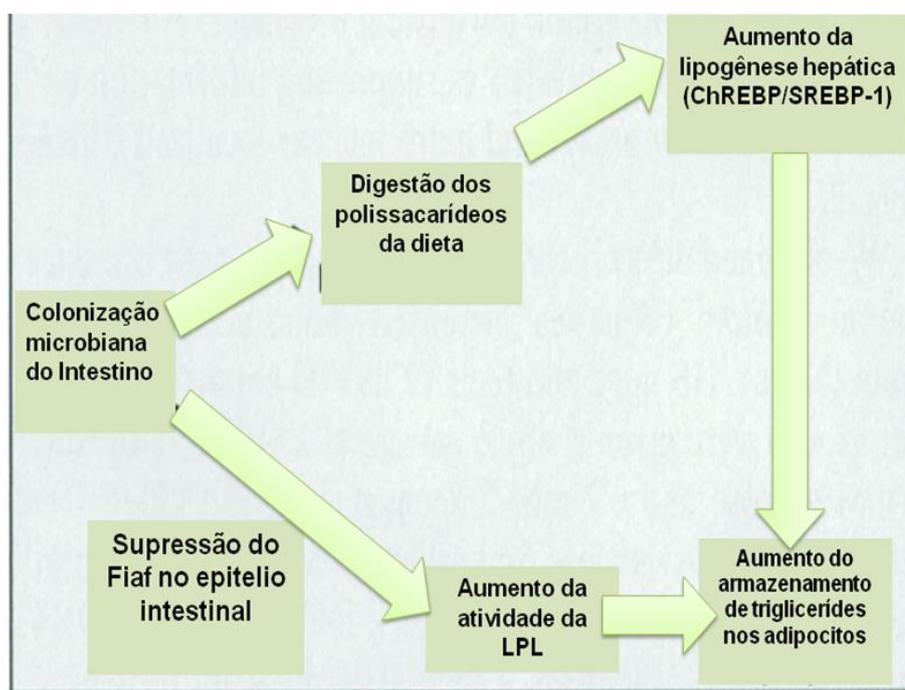


Figura 3. Visão esquemática de como a microbiota intestinal promove o armazenamento de gordura. Fonte: BACKHED et al (2004).

Estudos em camundongos *germ-free* foram associados a um aumento da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no fígado e no músculo, que protegem os animais de desenvolverem uma obesidade induzida por uma dieta rica em gorduras e açúcares. Esta enzima é responsável pelas

vias que aumentam o consumo de trifosfato de adenosina (ATP), como a glicólise e oxidação de ácidos graxos, e possui um papel importante no controle do consumo alimentar (TSUKUMO et al., 2009; FLINT, 2011; DEVARAJ, HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013).

#### 2.5.1.2 Atividade inflamatória e pró-inflamatória de espécies bacterianas associadas ao desenvolvimento da obesidade.

Além da captação e armazenamento de energia, as propriedades pró-inflamatórias atribuídas a algumas bactérias específicas da microbiota estão implicadas no desenvolvimento da obesidade (DARDENNE et al., 2009). Lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas estão associados à ativação de células do sistema imunológico e à indução de inflamação crônica em baixas doses. Estas endotoxinas são encontradas em quantidades significativas em soros de pessoas obesas (SPEAKMAN, 2004; LAM e LU, 2007; MATARESE, PROCACCINI e DE ROSA, 2008). O LPS interage com moléculas CD14 presentes em receptores do tipo TLR4, expressos por algumas células imunes e intestinal. Estes receptores, uma vez ativados, estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, relacionadas com a resistência à insulina (SPEAKMAN, 2004; LAM e LU, 2007; CORREA-DE-SANTANA et al., 2008).

Cani et al (2007), em estudo envolvendo camundongos, demonstraram que uma dieta rica em gordura resultou em uma redução significativa no número de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e no grupo *Clostridium coccooides-Eubacterium rectal*, levando a um aumento da relação bactérias Gram positivas/bactérias Gram negativas e um aumento de LPS no plasma. Esse aumento é conhecido como endotoxemia metabólica. Nesse mesmo estudo, ao injetar uma infusão subcutânea de LPS por quatro semana nesses animais e submetê-los a uma dieta normal, observou-se um aumento de peso e gordura corporal, acúmulo de triglicérides no fígado, resistência à insulina e diabetes nesses animais, bem como um aumento de substâncias pró- inflamatórias, como Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 (IL-1) e inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1).

Esse aumento de substâncias pró-inflamatórias gera uma inflamação de baixo grau, que terá papel relevante no desenvolvimento de resistência insulínica e diabetes (EVERARD e CANI, 2013).

#### *2.5.1.3 Regulação da permeabilidade da barreira intestinal.*

Estudos sugerem que a endotoxemia metabólica nos obesos pode ser devido a uma ruptura da integridade da barreira intestinal, como consequência da alteração da expressão, localização e disfunção de ocludina e zônula occludens-1, duas proteínas de junções ocludentes do intestino delgado. Alteração na microbiota de animais obesos em dieta rica em gordura, por meio de antibioticoterapia foi associada a um aumento na expressão de RNA mensageiro (RNAm) da proteína zônula occludens-1, e uma diminuição da endotoxemia metabólica. Esses dados sugerem uma participação da comunidade bacteriana intestinal no início das alterações da barreira intestinal (EVERARD e CANI, 2013).

Tem-se proposto, também, que o sistema endocanabinóide (eCB) está envolvido na regulação da função da barreira intestinal na obesidade. Este sistema é composto por lipídeos bioativos endógenos que se ligam principalmente a dois receptores acoplados a proteína G, o receptor canabinóide 1 (CB1) e 2 (CB2), presentes em todo o TGI. Na obesidade, CB1 está ligado a disfunção da barreira epitelial. Ao administrar antagonistas do CB1 em ratos obesos, observou-se uma diminuição da permeabilidade intestinal com uma consequente diminuição da endotoxemia nesses animais. Estudos revelaram uma redução da expressão de RNAm dessa proteína em camundongos, quando os animais foram tratados com antibióticos, sugerindo uma regulação direta dos CB1 pela MIH (CANI et. al., 2007; ALFENAS, 2012; EVERARD e CANI, 2013).

## **2.6 Métodos independentes de cultivo para estudo de comunidades microbianas.**

A MIH representa um importante fator na saúde e na doença dos seres humanos (CLEMENTE et al., 2012). Conhecer as comunidades microbianas dos diferentes ambientes e seu papel no ecossistema sempre foi um desafio para os pesquisadores. A limitação destes estudos no passado foi principalmente devido às metodologias utilizadas. Inicialmente, as investigações eram basicamente observações microscópicas (EIKELBOOM, 1975), porém as diferentes populações bacterianas não podiam ser distinguidas. A partir de métodos baseados em cultivo e isolamento, algumas bactérias começaram a ser identificadas, e essa metodologia foi indispensável para aumentar a compreensão a respeito de organismos específicos (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006).

Entretanto, a grande maioria dos microrganismos componentes da MIH não podem ser facilmente cultivados e, assim, as técnicas baseadas em cultura selecionavam apenas os microrganismos heterótrofos que melhor se adaptavam as condições de crescimento dos meios de cultivo (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006; WARD, WELLER e BATESON, 1990).

No final da década de 80, com o desenvolvimento da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987) e com os avanços na biologia molecular, os estudos da comunidade microbiana ganharam impulso. Inicialmente, com a biologia molecular aliada aos métodos de cultivo, foi possível confirmar a presença de bactérias específicas nos diferentes ambientes (BÖCKELMANN et al., 2000).

Para o estudo da MIH, a extração de DNA a partir de espécimes clínicos, como fezes ou fragmentos de biópsia, têm permitido avanços significativos no conhecimento e compreensão do papel dos microrganismos residentes intestinais em seres humanos e modelos animais experimentais. A biologia molecular, atualmente, permite o emprego de técnicas quantitativas e qualitativas direcionada a esses estudos pelo uso de técnicas únicas ou pela combinação de metodologias (TAGLIABUE e ELLI, 2013).

### 2.6.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante é uma técnica de *fingerprint* genético, ou seja, fornece um perfil da diversidade genética de uma comunidade (ERCOLINI, 2004). É relativamente recente e tem demonstrado ótimo potencial para comparação de perfis microbianos de comunidades complexas. Esta técnica é baseada em PCR ou *nested*-PCR com oligoiniciador modificado contendo um grampo GC de alto coeficiente de desnaturação cujos *amplicons* são aplicados em gel especial de poliacrilamida, com proporções graduais e crescentes de solventes desnaturantes (formamida e uréia) a uma temperatura constante de 60°C. Como resultado, teremos a separação de fragmentos de tamanhos semelhantes com sequências diferentes (ERCOLINI, 2004, BRAGA DA CRUZ, 2010; CARVALHO, 2012).

A dupla fita de DNA ao ser submetida ao gradiente desnaturante, irá desnaturar parcialmente em regiões especiais denominadas de domínios de separação. Com isso, sua motilidade no gel diminuirá. Fragmentos de DNA com mesmo tamanho, mas com a composição de pares de base diferentes terão uma resposta diferente frente ao gradiente desnaturante, formando bandas de acordo com seu perfil de desnaturação (ERCOLINI, 2004; BRAGA DA CRUZ, 2010).

### 2.6.2 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Nos últimos anos, os métodos de diagnóstico *in situ*, ou seja, aqueles que permitem a visualização direta dos microrganismos em seu ambiente vêm ganhando força como alternativa aos métodos tradicionais de detecção de patógenos, principalmente em estudos de comunidades microbianas complexas, como no caso da MIH (DOS SANTOS, 2011; NEVES e GUEDES, 2012).

A técnica de FISH desenvolvida na década de 80 é baseada na capacidade do RNA em se anelar com sequências complementares para formar híbridos DNA-RNA e RNA-RNA. Deste modo, sondas de oligonucleotídeos podem ser projetadas de maneira tal a terem especificidade que pode variar desde espécie até domínio (LANGENDIJK et al., 1995; DOS SANTOS, 2011; NEVES e GUEDES, 2012).

As sondas usadas no FISH são marcadas com fluorocromos e possuem tamanho adequado para penetrarem a membrana celular sem alterar a morfologia ou a integridade da célula. Ao atravessarem a membrana celular, formam ligações estáveis entre os nucleotídeos complementares por meio de ligações do tipo ponte de hidrogênio (ALMEIDA, 2009; DOS SANTOS, 2011; 73).

Para bactérias, a molécula alvo de escolha é o gene RNA ribossômico 16s (RNAr 16s), pois são funcionalmente constantes, bem distribuídos e conservados, e apresentam variabilidade suficiente em outras regiões, permitindo a discriminação de diferentes grupos taxonômicos (ALMEIDA, 2009; DOS SANTOS, 2011).

A técnica consiste basicamente em três etapas: fixação e permeabilização das células para entrada das sondas e prevenção de degradação do RNA por RNases; hibridização em condições adstringentes para garantir o anelamento ao sítio alvo específico em câmara escura e a temperatura que varia de 37 a 50°C; e lavagem para remoção do excesso de sonda. Após a hibridização, o material é analisado por microscópio de epifluorescência (DOS SANTOS, 2011; NEVES e GUEDES, 2012).

Alguns fatores metodológicos e ambientais podem interferir no resultado final da técnica de FISH, tais como a escolha da sonda, temperatura de hibridização, o tipo de ecossistema e o estado fisiológico das células bacterianas (ALMEIDA, 2009).

Esta técnica combina a precisão da biologia molecular com a informação visual da microscopia, permitindo a identificação e quantificação de células bacterianas *in situ* sem, portanto, requerer cultivo prévio, mostrando-se, dessa forma, bastante promissora (DOS SANTOS, 2011).

Do exposto, como já relatado anteriormente e considerando-se: (i) a importância da obesidade nos dias de hoje, considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde; (ii) o viés metodológico encontrado em estudos anteriores sobre o envolvimento da microbiota residente intestinal na obesidade; (iii) o universo amostral, geralmente pequeno e que não necessariamente represente a população avaliada; (iiii) a carência de dados regionais/nacionais, sócio-demográficos, de comportamento e clínicos associados aos achados microbiológicos no estudo da obesidade. Foi proposto esse estudo para, com uma amostragem mais representativa e a utilização de diferentes abordagens metodológicas independentes de cultivo, avaliar a diversidade bacteriana intestinal em indivíduos eutróficos e com sobrepeso para uma melhor associação entre microbiota, obesidade e características sociais e de comportamento, clínicas e nutricionais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar a diversidade bacteriana no ecossistema intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos e correlacionar o perfil microbiano com o perfil nutricional e características epidemiológicas destes pacientes.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Recrutar indivíduos, avaliação epidemiológica e avaliação nutricional para caracterização de participantes eutróficos, com sobrepeso e obesos na cidade de Juiz de Fora, MG;
- Obter amostras de espécimes fecais dos indivíduos participantes para estudos de diversidade bacteriana por metodologias independentes de cultivo;
- Obter DNA representativo do metagenoma intestinal a partir dos espécimes fecais dos indivíduos participantes categorizados em eutróficos, com sobrepeso e obesos;

- Avaliar a estrutura da comunidade bacteriana intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos, pela técnica de PCR seguida de eletroforese em gradiente de desnaturação (PCR-DGGE);
- Avaliar quantitativamente a distribuição de *Bacteroidetes- Flavobacteria*, *sphingobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* e *Clostridium hystoliticum* na microbiota intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos, pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH);
- Correlacionar a estrutura da comunidade e a carga microbiana com os dados bioquímicos e de perfil nutricional comparativamente entre os indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental está descrito no fluxograma 1.

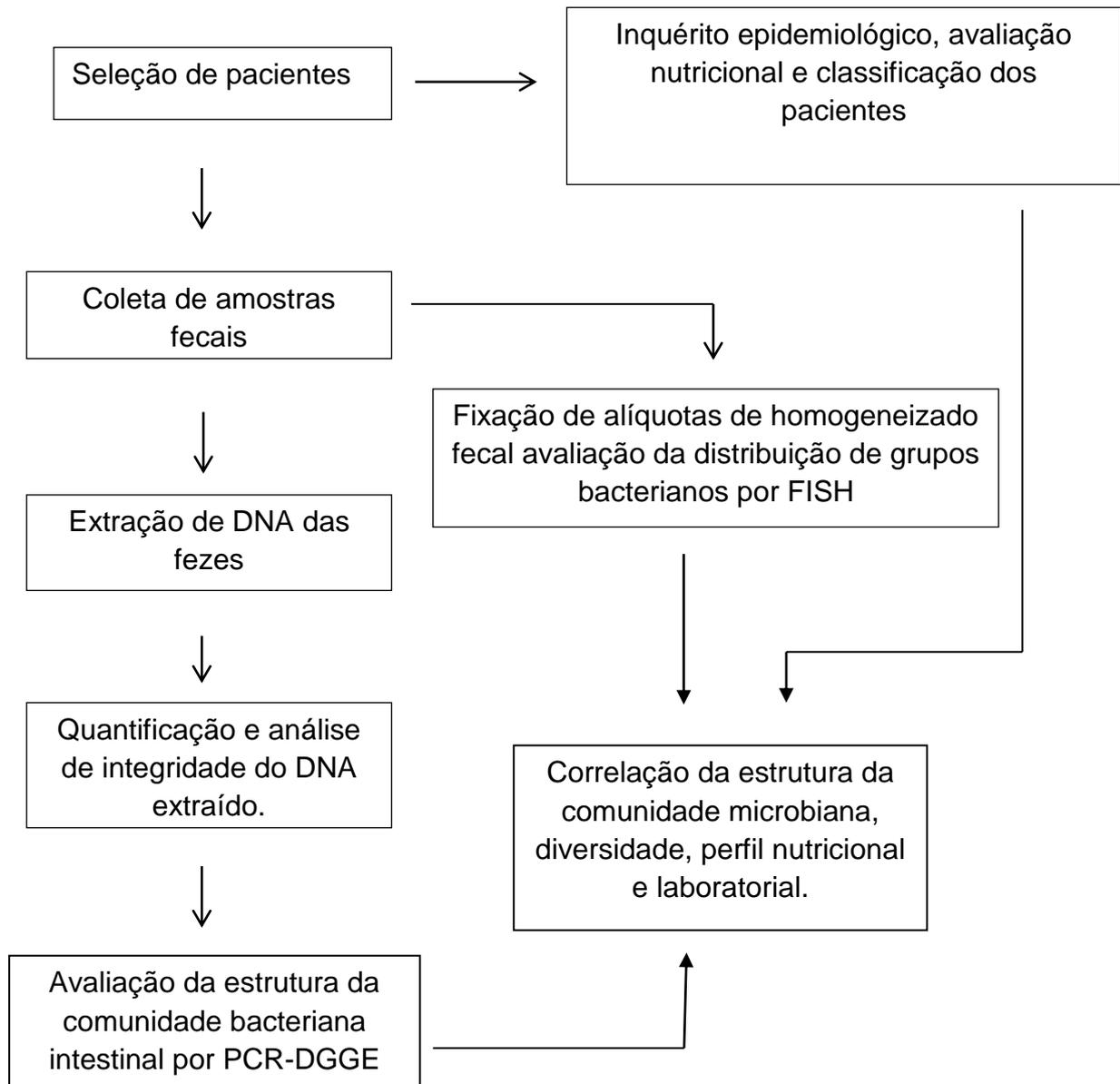


Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental

## 4.2 Seleção dos pacientes

Este estudo é do tipo transversal, 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 kg/m<sup>2</sup>. 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 A). Todos os voluntários foram informados a respeito dos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (Anexo B).

## 4.3 Inquérito epidemiológico e avaliação nutricional

Foi aplicado um questionário, para traçar os perfis sociodemográfico e clínico dos participantes (Anexo C). Para estimar a ingestão dietética habitual dos participantes, aplicou-se um questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA) adaptado (Anexo D). Para cada item do QQFA, validado por Cardoso e Stocco (2000), os voluntários informaram a frequência média de consumo habitual (diária, semanal ou mensal) relativa aos últimos seis meses e o tamanho da porção ingerida. Para ajudar os participantes na estimativa das porções foi utilizado álbum fotográfico elaborado por Sales, Costa e Silva (2004). A análise de consumo alimentar habitual foi realizada utilizando as tabelas de composição de alimentos TACO Nepa-Unicamp (2011); Philippi, (2013) e Pacheco, (2011).

Para estimativas das quantidades de macronutrientes ingeridos (carboidratos, lipídios, proteínas) e fibras, bem como calorias totais, utilizou-se como fonte de referência as Ingestões Dietéticas de Referências – *Dietary Reference Intakes* (DRI), que são recomendações empregadas tanto para a avaliação quanto para o planejamento de dietas de indivíduos e grupos (IOM,

2005). Também foi analisada a distribuição relativa dos macronutrientes da dieta em relação ao Valor Energético Total (VET), tendo como referência os valores recomendados de AMDR (*Acceptable Macronutrients Distribution Range*) (IOM, 2005). Sendo assim, é considerada adequada uma dieta que forneça entre 45% e 65% das calorias advindas de carboidratos, já para as proteínas, a distribuição ideal é entre 10% e 35% das calorias e de 20% a 35% do total de calorias da dieta de origem lipídica. Para as fibras totais da dieta foram considerados os valores de recomendação da AI (*Adequate Intake*): 38g e 30g para homens de 14 a 50 anos e acima de 51 anos, respectivamente e de 25g e 21g para mulheres de 19 a 50 anos e acima de 51 anos, respectivamente.

Para a análise qualitativa do QQFA, cada alimento da lista foi classificado de acordo com seu grau de processamento, como proposto por Monteiro et al. (2010), e divididos em três grupos, cujo detalhamento é apresentado no Anexo E. Quando o item do QQFA era uma preparação caseira, por definição, não processada industrialmente, esta teve seus ingredientes desmembrados e cada um classificado apropriadamente.

Calculou-se ainda, a necessidade estimada de energia (EER) para cada paciente, de acordo com as seguintes fórmulas recomendadas pelo IOM (2005):

- Homens eutróficos (> 19 anos)  
$$\text{EER (kcal/dia)} = 662 - 9,53 \times I + \text{CAF} \times (15,91 \times P + 539,6 \times A);$$
- Mulheres eutróficas (> 19 anos)  
$$\text{EER (kcal/dia)} = 354 - 6,91 \times I + \text{CAF} \times (9,36 \times P + 726 \times A)$$
- Homens com sobrepeso ou obesidade (> 19 anos)  
$$\text{EER (kcal/dia)} = 1086 - 10,1 \times I + \text{CAF} \times (13,7 \times P + 416 \times A)$$
- Mulheres com sobrepeso ou obesidade (> 19 anos)  
$$\text{EER (kcal/dia)} = 448 - 7,95 \times I + \text{CAF} \times (11,4 \times P + 619 \times A).$$

Onde: I= idade em anos, P= peso atual em Kg, A= altura em metros e CAF= coeficiente de atividade física.

Foram utilizados na avaliação antropométrica, o peso atual (Kg), altura (cm), as medidas de índice de massa corporal (IMC), circunferências da cintura (CC), abdominal (CA) e quadril (CQ) (Anexo F). 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 (m<sup>2</sup>) e avaliado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000).

As aferições das circunferências foram feitas usando fita métrica flexível e inextensível de 150 cm 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 WHO, 2008, onde CC ≥ 94 cm e ≥ 80cm indica risco cardiovascular para homens e mulheres, respectivamente. Já Circunferência abdominal foi medida na altura da cicatriz umbilical também com a roupa afastada e a circunferência do quadril foi aferida na área de maior proeminência da região glútea. A relação cintura quadril (RCQ) foi 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 >0,95 para homens e >0,85 para mulheres são indicativos de obesidade andróide e risco aumentado de doenças metabólicas relacionadas com a obesidade.

#### 4.4 Análises bioquímicas

Análises bioquímicas como glicemia, dosagem de insulina, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, creatinina; hormonal como cortisol; hemograma e cálculo dos índices Homa-IR e Homa-Beta foram realizados no laboratório Cortes Villela, em Juiz de Fora - MG, após coleta de sangue periférico *in situ*, dentro de convênio estabelecido para a realização deste estudo, sem custo para os participantes.

De acordo com as rotinas já estabelecidas no laboratório, as determinações bioquímicas e hormonais (glicose, colesterol total e frações, triglicérides, creatinina, cortisol e insulina) foram realizadas em equipamento automatizado Advia 1200/Siemens e hemograma em equipamento automatizado Coulter LH 750/Coulter com posterior revisão de lâmina. O índice Homa foi obtido pelo cálculo do quociente entre glicose e insulina da seguinte forma:

- HOMA-IR  
$$\text{insulina jejum } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glicose jejum } (\text{mmol/L}) / 22,5$$
- HOMA-BETA  
$$(20 \times \text{insulina jejum } (\mu\text{UI/mL})) / (\text{glicose jejum } (\text{mmol/L}) - 3,5)$$

Após revisão técnica e liberação dos laudos, os exames foram enviados para os pesquisadores na UFJF e disponibilizados também para os participantes do estudo.

#### 4.5 Coleta de amostras fecais e preparação para análises microbiológicas

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 alíquotadas.

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%.

#### **4.6 Extração de DNA a partir dos espécimes 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.

#### 4.7 Hibridização *in situ* Fluorescente (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. Dezesesseis sondas de oligonucleotídeos específicos ao RNAr 16S dos diferentes grupos pesquisados e uma sonda controle negativa (*Operon Technologies Inc. Alameda, CA, USA*), marcadas com o fluoróforo Cy3, foram sendo utilizadas nesse estudo (Tabela 1).

Tabela 1: Sondas, táxons, sequências e concentração de formamida utilizadas nos experimentos de FISH.

Sonda	Taxon	Sequência (5'-3')	Formamida*	Referência
Alf968	α-Proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	30%	Manz et al., 1996
Bet42a	β-Proteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	30%	Manz et al., 1992
Gam42a	γ-Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	30%	Manz et al., 1992
HGC69a	Actinobacteria	TATAGTTACCACCGCCGT	30%	Manz et al., 1992
EUB III	Verrucomicrobia	GCTGCCACCGCTAGGTGT	30%	Daims et al., 1999
Chis150	Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	35%	Franks et al., 1998
LGC354b	Firmicutes	CGGAAGATTCCCTACTGC	35%	Meier et al., 1999
LGC354a	Firmicutes	TGGAAGATTCCCTACTGC	35%	Meier et al., 1999
LGC354c	Firmicutes	CCGAAGATTCCCTACTGC	35%	Meier et al., 1999
CF319a	Flavobacteria, Bacteroidetes, Sphingobacteria	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35%	Manz et al., 1996
BAC303	<i>Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Porphyromonadaceae</i>	CCAATGTGGGGGACCTT	40%	Manz et al., 1996
ENTE183	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTCTTTGGTCTTGCGACG	20%	Friedrich et al., 2003
ENTE5	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTTCCCAGACATTACTCACC	20%	Kyselkova et al., 2009
Non	Controle negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	30%	Wallner; Amann; Beisker, 1993

\* Proporção de formamida (%V/V) na solução de hibridização.

As sondas LGC354a, LGC354b, LGC354c foram misturadas de maneira a terem as mesmas concentrações, assim como as sondas ENT183 e ENT5. A mistura foi feita para abranger o maior número possível de bactérias pertencentes ao grupo estudado. Às sondas Bet42a e Gam42a foram acrescentadas, em proporções iguais, sondas competidoras. Na sonda Bet42a foi acrescentada a sonda Gam42a sem fluorocromo, e à sonda Gam42a foi acrescentada a sonda Bet42a sem fluorocromo. O acréscimo da sonda competidora é necessário devido a grande similaridade das sequências a que as sondas se ligam.

A contagem das células microbianas totais e a contagem de células pertencentes a cada um dos grupos foram realizadas utilizando o microscópio *Olympus BX60* equipado com os filtros DAPI 31000 e Cy3 41007a (*Chroma, Bellows Falls, VT, USA*), respectivamente. A contagem foi realizada em 3 campos aleatórios por um único pesquisador treinado. O número final de bactérias foi calculado levando-se em consideração as diluições realizadas durante o tratamento das amostras. Os resultados da densidade microbiana total, expressos em Log/g de conteúdo fecal, e dos grupos em porcentagem relativa à densidade microbiana total.

#### **4.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)**

A estrutura da comunidade bacteriana intestinal de participantes obesos, sobrepesos e eutróficos foram avaliados pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

##### 4.8.1 Amplificação de DNAr 16S de representantes do domínio Bactéria utilizando oligoiniciadores específicos

Fragmentos do gene codificador dos RNAr 16S de grupos microbianos específicos representantes do domínio Bactéria foram amplificados por PCR. O

molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA metagenômico extraído das amostras de fezes.

Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação foram F984GC (5'-gc.-AACGCGAAGAACCCTTAC-3') (gc = sequência rica em G+C) (HEUER et al., 1997) e R1378 (5'-ACGGGCGGTGTGTACA -3') (BLACKWOOD et al., 2005) para amplificação da região V6 do DNA correspondente ao RNA 16s bacteriano. A reação de PCR continha aproximadamente 20 ng/μL de DNA total, 0,5 μL de cada primer (10 μM) e como mistura da reação foi utilizado o PCR *Master Mix*® (Promega, USA).

A PCR foi realizada tal como descrito anteriormente (GELSOMINO; CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Techne® TC-412. Os *amplicons* obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose (Sigma-Aldrich, USA) 1,2% em TBE (Tris-base, ácido bórico e EDTA), e corados com brometo de etídio (Promega, USA). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de *100bp plus DNA ladder ready-to-use* (Bioron) para estimativa dos tamanhos dos *amplicons*.

#### 4.8.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Foram aplicados 20 μL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE (tris-acetato-EDTA) 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 30% a 70% utilizando-se como agentes desnaturantes, uréia, 7M, e formamida desionizada 40% v/v, a partir de duas soluções estoque de poliacrilamida a 0% (solução acrilamida/bisacrilamida 20% v/v, TAE 50X 2% v/v, água q.s.p) e 100% (solução acrilamida/bisacrilamida 20% v/v, TAE 50X 2% v/v, uréia 7M, e

formamida desionizada 40% v/v) e dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 *Gradient Delivery System* – BIO-Rad Califórnia, USA). Além das soluções estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletileno diamino) (catalisador) e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X para visualização do gradiente).

A eletroforese foi realizada em temperatura e voltagem constantes (60°C e 50V), durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de *SYBER® Gold* (Invitrogen™), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel visualizada no transluminador ultravioleta *ImageQuant 100* (GE Healthcare) e capturada com o auxílio da câmera ED LENS SP-500 UZ (Olympus).

#### 4.9 Análise estatística

Para análise dos dados foram utilizadas as ferramentas estatísticas SPSS versão 20,0, XLstat 2014 e PAST 3.0. Para as variáveis contínuas foram utilizadas medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão), enquanto para as variáveis categóricas foram utilizada distribuição percentual. Os dados obtidos foram avaliados quanto o tipo de distribuição, usando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Teste de *Grubbs* para valores extremos foi aplicado nos resultados de contagem bacteriana específica, calorias e macronutrientes.

Foi utilizado teste t de *Student* para comparações dos dados antropométricos, laboratoriais, densidade microbiana, bem como para a comparação dos diferentes grupos bacterianos nos espécimes fecais amostrados e na análise qualitativa do QQFA. Valores de *p* menores que 5 % ( $p < 0,05$ ) foram considerados significantes.

Uma matriz binária foi construída a partir dos eletroforegramas obtidos pela técnica de PCR-DGGE, com auxílio do programa *pyElph* 1.4 para a marcação das bandas. A variável riqueza foi estimada com base nessa matriz

binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como “1” e ausência como “0”. Para a análise dos resultados de riqueza as médias dos grupos foram avaliadas pelo “teste t de *Student*”. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A partir da matriz, também, realizou-se uma análise de agrupamento. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada de acordo com o cálculo do coeficiente de *Jaccard* de similaridade e pelo método *Unweighted Pair Group average* (UPGMA) na análise de agrupamentos.

As análises de correlação entre as densidades absolutas (log/g de fezes) dos grupos bacterianos e os parâmetros bioquímicos e nutricionais foram realizadas pelo teste de correlação de *Spearman*. As análises foram realizadas separadamente por grupo estudado.

A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* foi determinada pela razão entre as densidades absolutas de cada grupo microbiano. Essa medida é considerada um valor preditivo do desequilíbrio microbiano no trato gastrointestinal em indivíduos com microbiota alterada na obesidade (Ley et al., 2006).

A análise de correlação entre IMC, glicose sérica, calorias e colesterol total frente à alteração da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* foi realizada calculando-se o *odds ratio* (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.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características epidemiológicas e clínicas dos participantes

Após classificação dos indivíduos estudados nos grupos correspondentes (eutrófico, com sobrepeso e obeso), foram avaliadas as características demográficas. Dos 72 indivíduos amostrados 63,9% eram do sexo feminino e 36,1% do sexo masculino, com uma média de idade de 39,6 anos, representativo de indivíduos adultos. Os dados de gênero e idade por grupo são apresentados na tabela 2. Em seguida foram avaliados as variáveis estado civil, cor da pele autodeclarada, renda mensal, e escolaridade dos pacientes (tabela 3). Nossos dados mostram 80% dos participantes classificados como obesos possuem uma renda familiar mensal de 1 a 3 salários mínimos, sendo inseridas, segundo o instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE), nas classes sociais D e E, e que, a maioria desses indivíduos, são do sexo feminino.

Tabela 2. Sexo e idade dos participantes deste estudo.

	Eutrófico	Sobrepeso	Obeso
Masculino (%)	20,8	50,0	37,5
Feminino (%)	79,2	50,0	62,5
Média Idade	37,9	38,1	42,8

Tabela 3. Características epidemiológicas dos participantes do estudo

Variáveis analisadas	Grupos de indivíduos		
	Eutróficos (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n= 24)
<b>Estado civil</b>			
Solteira (o)	12 (50%)	8 (33,3%)	10 (41,6%)
Casada (o)	11 (45,8%)	14 (58,3%)	13 (54,1%)
Outro	1 (4,1%)	2 (8,3%)	1 (4,1%)
<b>Raça (cor da pele)</b>			
Branca	16 (66,6%)	15 (62,5%)	12 (47,4%)
Parda	5 (20,8%)	4 (16,7%)	7 (42,1%)
Negra	2 (8,3%)	4 (16,7%)	5 (10,5%)
Outra	1 (4,1%)	1 (4,1%)	0
<b>Renda mensal*</b>			
1-3	11 (45,8%)	12 (50,0%)	20 (83,4%)
4-6	2 (8,3%)	8 (33,4%)	0
7-9	3 (12,5%)	2 (8,3%)	2 (8,3%)
10 ou mais	8 (33,4%)	2 (8,3%)	2 (8,3%)
<b>Escolaridade</b>			
Fundamental completo	2 (8,3%)	6 (25%)	6 (25,0%)
Fundamental incompleto	4 (16,6%)	7 (29,1%)	6 (25,0%)
Médio completo	4 (16,6%)	7 (29,1%)	6 (25,0%)
Médio incompleto	1 (4,1%)	0	1 (4,2%)
Superior completo	11 (45,8 %)	3 (12,5%)	3 (12,5%)
Superior incompleto	2 (8,3 %)	1 (4,1%)	2 (8,3%)

\*Renda mensal em salários mínimos no Brasil em 2015 (R\$ 788,00).

As características clínicas encontram-se descritas na tabela 4, e as laboratoriais na tabela 5. De maneira geral, entre os participantes obesos, 62% relataram sofrer de alteração na pressão arterial, frente a 12% no grupo com sobrepeso e 4% no grupo eutrófico. Embora os valores das médias de glicose sérica, insulina basal, estejam dentro dos valores de referência, houve diferença estatística principalmente entre as médias dos grupos de eutrófico e obeso, com os obesos tendendo a uma maior concentração sérica de glicose (11% maior que os eutróficos) e insulina (124% maior que os eutróficos).

Os dados antropométricos e valores de  $p$  para teste de normalidade e comparação de médias encontram-se na tabela 6. Os valores de Circunferência da cintura, circunferência abdominal, circunferência do quadril e relação cintura quadril foram analisados separadamente por sexo dentro dos grupos, uma vez que os valores de referência são diferentes. Houve diferença estatística significativa em todos os parâmetros analisados entre os três grupos em indivíduos do sexo feminino com um aumento nos valores com o avanço do IMC. Nos indivíduos do sexo masculino não encontramos diferença nas medidas de circunferência da cintura e relação cintura–quadril entre nenhum dos três grupos.

Tabela 4. Características clínicas e comportamentais dos participantes do estudo.

Variáveis analisadas	Grupos de indivíduos		
	Eutróficos (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n= 24)
<b>Doenças cardíacas</b>			
Sim	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)
Não	23 (96%)	23 (96%)	21 (88%)
Não Sabe	0	0	1 (4%)
<b>Alteração pressão arterial</b>			
Sim	1 (4%)	3 (12%)	15 (62%)
Não	23 (96%)	21 (88%)	9 (38%)
Não sabe	0	0	0
<b>Doença tireoidiana</b>			
Sim	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)
Não	23 (96%)	23 (96%)	16 (84%)
Não sabe	0	0	1 (8%)
<b>Depressão</b>			
Sim	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)
Não	23 (96%)	23 (96%)	22 (92%)
Não sabe	0	0	0
<b>Doença hepática</b>			
Sim	0	1 (4%)	1 (4%)
Não	24 (100%)	23 (96%)	23 (96%)
Não sabe	0	0	0
<b>Outras doenças</b>			
Sim	3 (12%)	3 (12%)	2 (8%)
Não	21 (88%)	21 (88%)	22 (92%)
Não sabe	0	0	0
<b>Fumante</b>			
Sim	2 (8,3%)	5 (20,8%)	0
Não	22 (91,7%)	19 (79,2%)	24 (100%)
<b>Atividade Física</b>			
Sim	14 (58,3%)	11(45,8%)	11(45,8%)
Não	10 (41,7%)	13(54,2%)	13(54,2%)

Tabela 5. Dados laboratoriais dos participantes do estudo.

Parâmetros	Grupos de indivíduos			Valor de <i>p</i>				VR <sup>a</sup>
	Eutrófico (eut)	Sobrepeso (sob)	Obeso (ob)	<i>p</i> <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>c</sup> (eut x sob)	<i>p</i> <sup>c</sup> (eut x ob)	<i>p</i> <sup>c</sup> (sob x ob)	
Glicose sérica (mg/dl)	85,4±9,25	90,13±9,10	95,58±18,96	0,940	0,850	0,025	0,213	60-99
Insulina Basal (mcUI/mL)	5,53±2,36	8,55±3,47	12,44±9,08	1,705	0,001	0,002	0,065	2,0-25
HOMA-IR	1,22±0,55	1,93±0,74	2,95±2,20	1,724	0,001	0,001	0,050	*
HOMA-β	108,00±80,24	129,96±64,00	161,22±127,37	1,880	0,308	0,097	0,303	**
Triglicérides (mg/dl)	107,87±53,45	107,29±52,96	159,70±124,18	1,384	0,970	0,067	0,063	<150
Colesterol total (mg/dL)	189,12±33,11	186,41±38,47	197,5±44,58	0,831	0,790	0,464	0,361	< 200
Colesterol LDL (mg/dL)	112,92±26,08	115,56±35,09	122,26±33,27	0,695	0,760	0,289	0,512	<100
Colesterol HDL (mg/dL)	56,41±11,39	49,70±10,91	45,33±9,87	0,674	0,040	0,010	0,153	>60
Creatinina Sérica (mg/dl)	0,98±0,11	0,94±0,16	0,97±1,78	0,660	0,380	0,938	0,519	0,6-1,1
Cortisol Basal (mcg/dL)	16,01±6,03	12,65±5,57	10,17±3,28	0,933	0,060	<0,001	0,770	6,7-22,6
Hemoglobina (g/dL)	13,41±1,34	14,16±1,28	19,26±26,17	3,86	0,056	0,280	0,345	11,0-18,0
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	6150±1944	6075±1168	6692±2035	1,071	0,872	0,351	0,204	4000-10000
Neutrófilos Segmentados (%)	53,37±9,8	54,58±8,31	53,84±11,62	2,073	0,347	0,456	0,527	50%-70%
Monócitos (%)	7,69±2,07	7,11±1,77	7,17±1,64	1,076	0,301	0,343	0,893	4%-10%

<sup>a</sup>Valores de referência segundo BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008. <sup>b</sup>Valores de *P* para o teste de Kolmogorov-Smirnov. <sup>c</sup> valores de *P* para teste T de student\*Valores de Referência de Homa-IR: IMC até 25 = 0,4- 2,9; IMC 25-30 = 0,4- 4,3; IMC > 30 = 0,7- 8,2; \*\*Valores de referência de HOMA-β expresso em porcentagem, tendo como referencial 100%.

Tabela 6. Características antropométricas dos participantes do estudo.

Parâmetros	Grupos de indivíduos			Valor de <i>p</i>			VR <sup>a</sup>
	Eutrófico (eut)	Sobrepeso (sob)	Obeso (ob)	<i>p</i> <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>c</sup> (eut x sob)	<i>p</i> <sup>c</sup> (eut x ob)	
IMC	22,81±1,76	29,70±14,05	36,9±6,04				
Circunferência Abdominal				1,09			
Mulheres	82,3±4,9	94,6±5,8	118,7±14,1		<0,001	<0,001	<0,001
Homens	93,8±9,8	94,7±4,1	111,22±16,6		0,72	0,03	0,001
Circunferência da cintura				1,13			
Mulheres	74,9±4,3	86,4±4,9	113,3±15,8		<0,001	<0,001	<0,001
Homens	89,6±11,5	91,0±4,9	110,7±17,4		0,78	0,06	0,004
Circunferência Quadril				1,78			
Mulheres	99,21±4,8	105,9±4,7	124,1±13,0		<0,001	<0,001	<0,001
Homens	99,6±4,01	104,9±3,9	99,7±33,5		0,23	0,99	0,59
Relação Cintura/Quadril				0,81			
Mulheres	0,75±0,40	0,81±0,50	0,93±0,08		<0,001	<0,001	0,001
Homens	0,89±0,98	0,86±0,05	0,99±0,15		0,42	0,22	0,14

<sup>a</sup>Valores de *P* para o teste de Kolmogorov-Smirnov. <sup>b</sup> valores de *P* para teste T de *student* \*Valores de referências segundo WHO, 2000; \*\* Não há valores de referência. H = Homem; M = Mulher.

## **5.2. Consumo calórico, de macronutrientes e fibras.**

O consumo de calorias, macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídeos) e fibras, referentes aos últimos seis meses, pelos grupos em estudo encontram-se nas figuras 5, 6A, 6B, 6C e 6D, respectivamente. A tabela com a média e desvio padrão do cálculo das calorias, macronutrientes e fibras encontram-se no.

A ingestão de calorias foi maior no grupo de obesos quando comparado ao grupo de eutróficos, assim como a ingestão de carboidratos ( $p < 0,05$ ). O grupo de indivíduos com sobrepeso mostrou um consumo intermediário de calorias e carboidratos entre os grupos eutróficos e obeso.

Não houve diferença no consumo de lipídeos e proteínas entre os grupos, e o grupo de indivíduos obesos mostrou um maior consumo de fibras em relação ao grupo eutrófico. O grupo com sobrepeso mostrou um consumo intermediário destes nutrientes.

As tabelas contendo as quantidades de calorias ingeridas, quantidades de calorias recomendadas e a diferença entre ingerida e recomendada de cada indivíduo pertencente aos grupos eutróficos, com sobrepeso e obesos, encontram-se nos apêndices A, B e C.

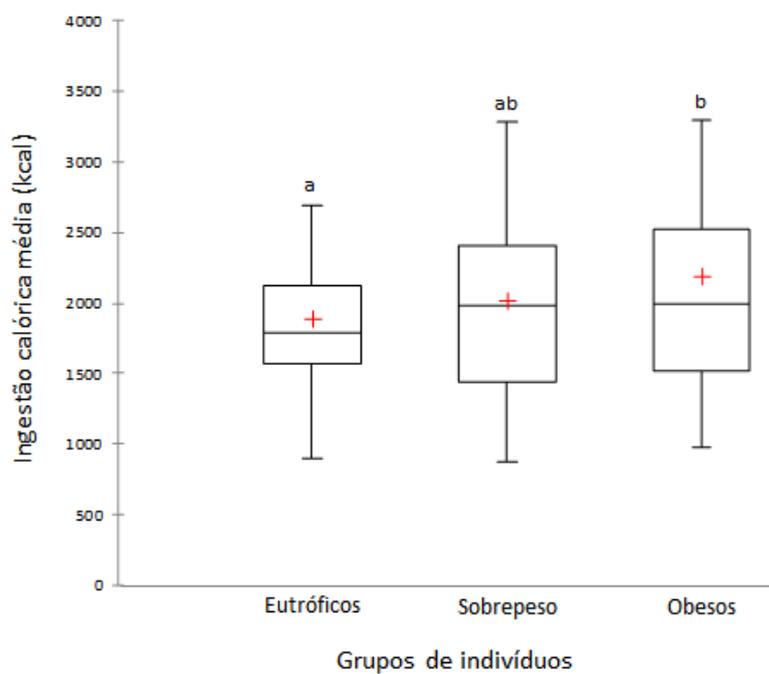


Figura 5. Média da ingesta calórica pelos indivíduos dos grupos em estudo. As letras a e b indicam diferença significativa no consumo calórico entre os grupos ( $p < 0.05$ ).

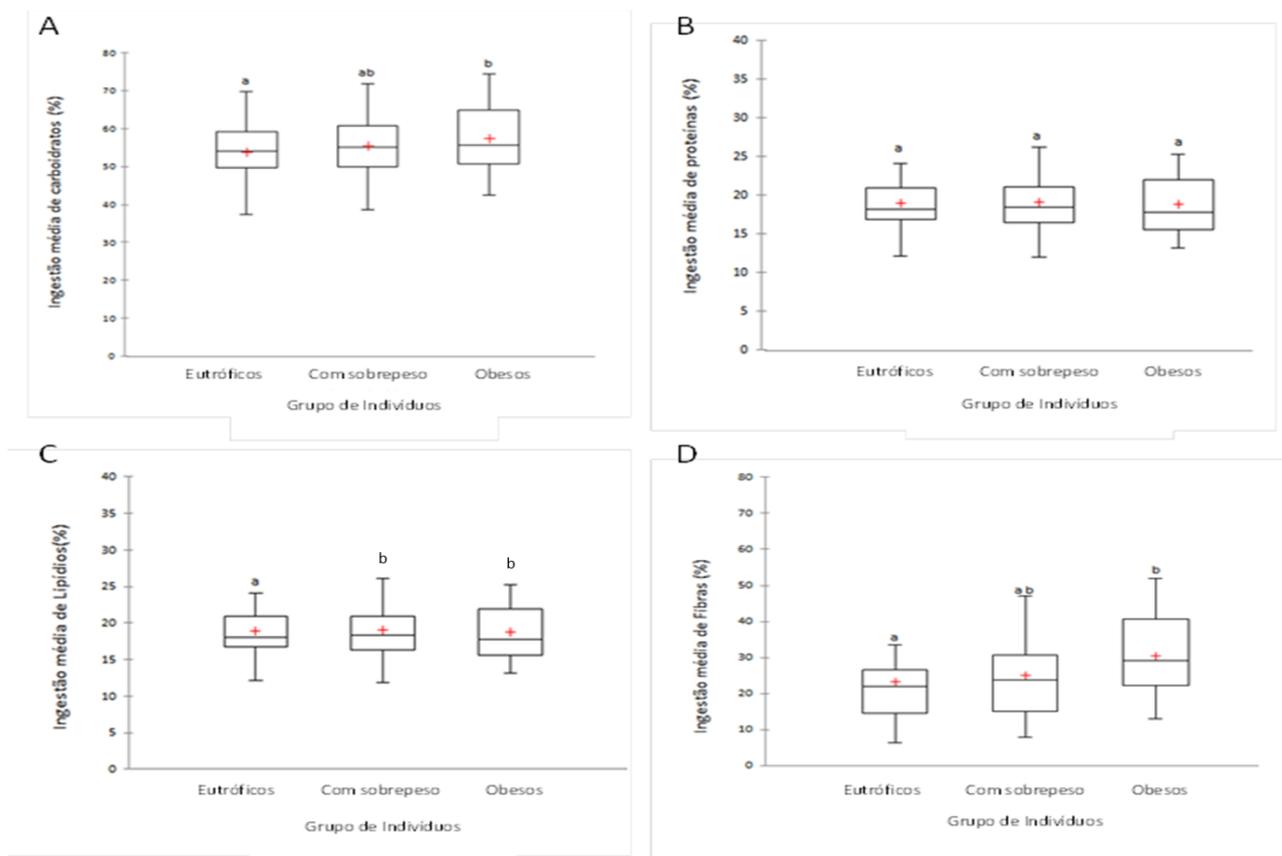


Figura 6. Média da ingesta de grupos de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos em estudo. As letras a, b e c indicam diferença significativa no consumo de diferentes nutrientes entre os grupos ( $p < 0.05$ ). A – ingestão de carboidratos; B – ingestão de proteínas; C – ingestão de lípidios; D – ingestão de fibras.

A análise qualitativa do QQFA (tabela 7) não mostrou diferença significativa na fração em que cada grupo alimentar contribui para a ingestão calorica total entre os grupos estudados.

Tabela 7. Média absoluta e relativa da fração de ingestão energética total pelos participantes do estudo, por grupos de alimentos e valores de *P*.

Grupo de indivíduos	Fração da ingestão energética total			
	Kcal <sup>a</sup>	ANMP <sup>b</sup> n=47*	AP <sup>c</sup> n= 23*	AUP <sup>d</sup> n=35*
Eutrófico (Eu)	1892	982 (51,9%)	473 (25%)	437 (23,1%)
Sobrepeso (Sob)	2015	1064 (52,8%)	496 (24,6%)	455 (22,6%)
Obesos (Ob)	2191	1144 (52,2%)	572 (26,1%)	475 (21,7%)
Valores de <i>p</i>				
Eu x Sob		0,57	0,81	0,88
Eu x Ob		0,43	0,16	0,22
Sobx Ob		0,18	0,19	0,19

<sup>a</sup> Ingestão energética total; <sup>b</sup> Alimentos in natura ou minimamente processados; <sup>c</sup> Alimentos processados; <sup>d</sup> Alimentos ultraprocessados; \* Número de alimentos total de cada grupo presentes no QQFA.

### 5.3 Avaliação quantitativa da densidade bacteriana total e grupos bacterianos pela técnica de FISH.

Os resultados deste estudo indicam que não houve diferença na densidade bacteriana total nos espécimes fecais representativos da microbiota intestinal nos diferentes indivíduos participantes categorizados em eutróficos, com sobrepeso e obesos (Figura 7).

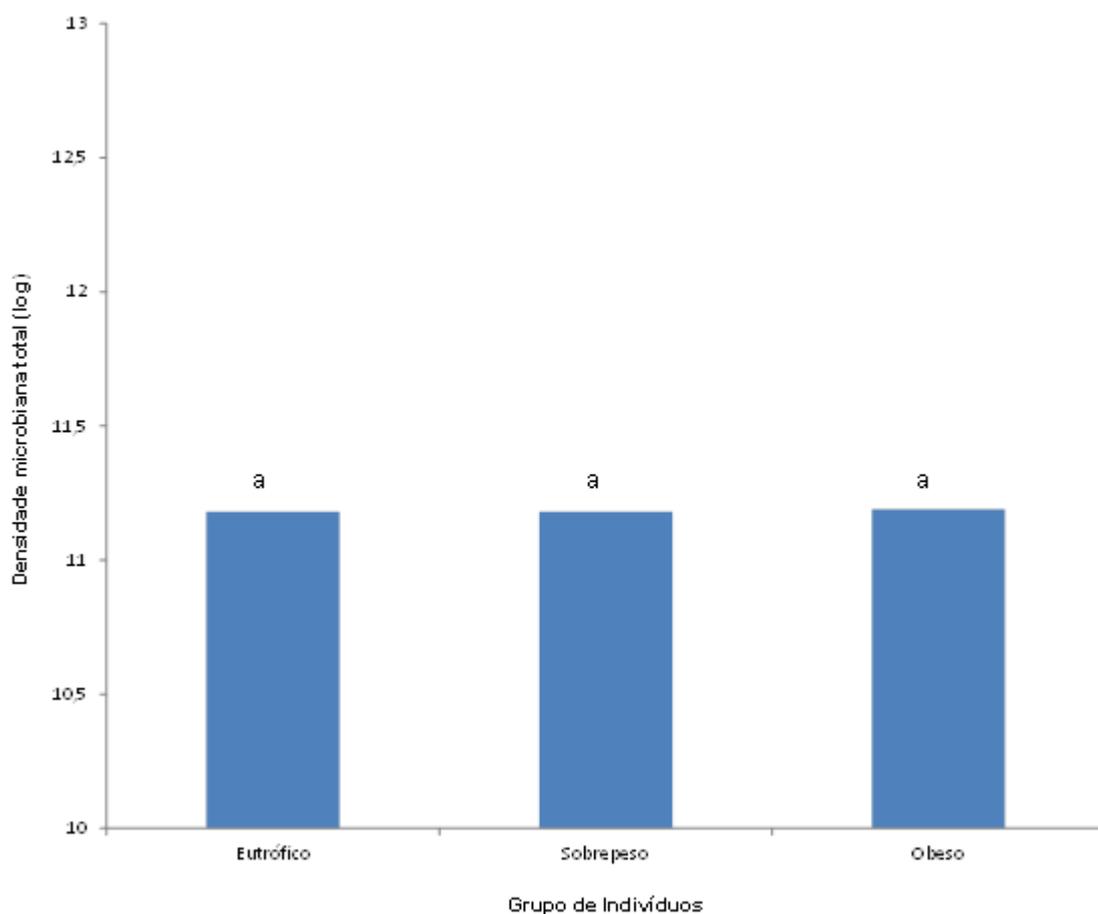


Figura 7. Densidade microbiana total nos grupos estudados. Letras distintas diferem entre si a nível de significância de 95% pelo teste T de Student. (( $p < 0.05$ )).

Considerada um marcador microbiano importante preditivo do desequilíbrio microbiano no trato gastrintestinal em indivíduos com microbiota alterada na obesidade, a razão entre a densidade absoluta de *Firmicutes/Bacteroidetes* nos indivíduos avaliados está relacionada no APÊNDICE D, sendo este número > 1 em 50% dos indivíduos obesos, 20,8% nos indivíduos com sobrepeso, e 12% nos eutróficos.

Em relação a densidade relativa bacteriana, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* apresentou uma densidade menor no grupo obeso, comparado com o grupo eutrófico, porém, levando-se em consideração a relação *Firmicutes/Bacteroidetes*, esta encontra-se maior no grupo de indivíduos obesos, sugerindo, dessa forma, um aumento relativo desse filo em relação ao filo *Bacteroidetes* nesse grupo. Os filios *Verrucomicrobia* e *Y-Proteobactéria*; as famílias *Enterobacteroidaceae*, *Bacteroidaceae-Prevotellaceae*-*Porphyromonadaceae* e o grupo *Clostridium histolyticum*, também foram menos observados no grupo obeso, quando comparado ao grupo eutrófico. O grupo com sobrepeso apresentou densidade bacteriana semelhante à encontrada nos indivíduos do grupo obeso considerando-se os representantes dos filios *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, em relação aos representantes das classes *Y-Proteobactéria* e, ainda em relação à densidade dos representantes das famílias *Enterobacteriaceae* e *Bacteroidaceae*. Em relação ao grupo de indivíduos eutróficos, as densidades bacterianas dos representantes dos filios *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, foi semelhante àquela encontrada nos indivíduos do grupo com sobrepeso (Figuras 8 e figura 9).

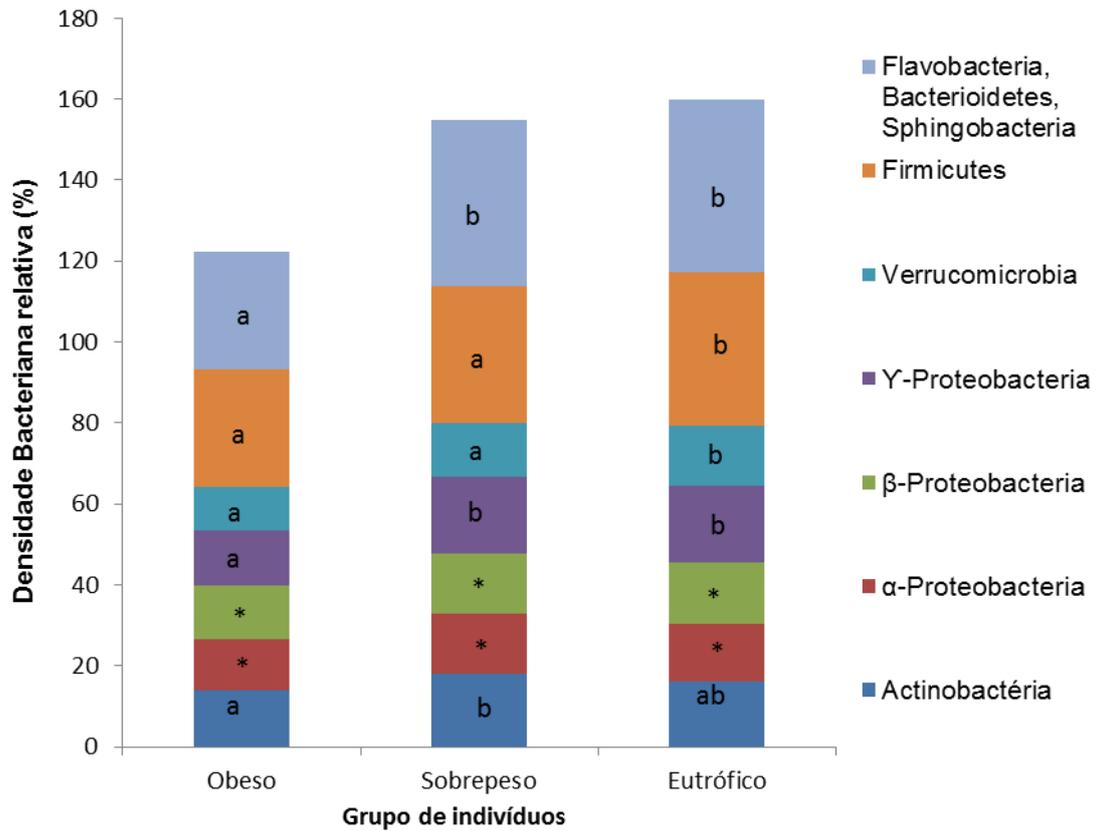


Figura 8. Densidade bacteriana relativa dos filos e classes estudados. Letras distintas diferem entre si a nível de significância de 95% pelo teste T de Student ( $p < 0.05$ ). \* Não houve diferença significativa entre os grupos.

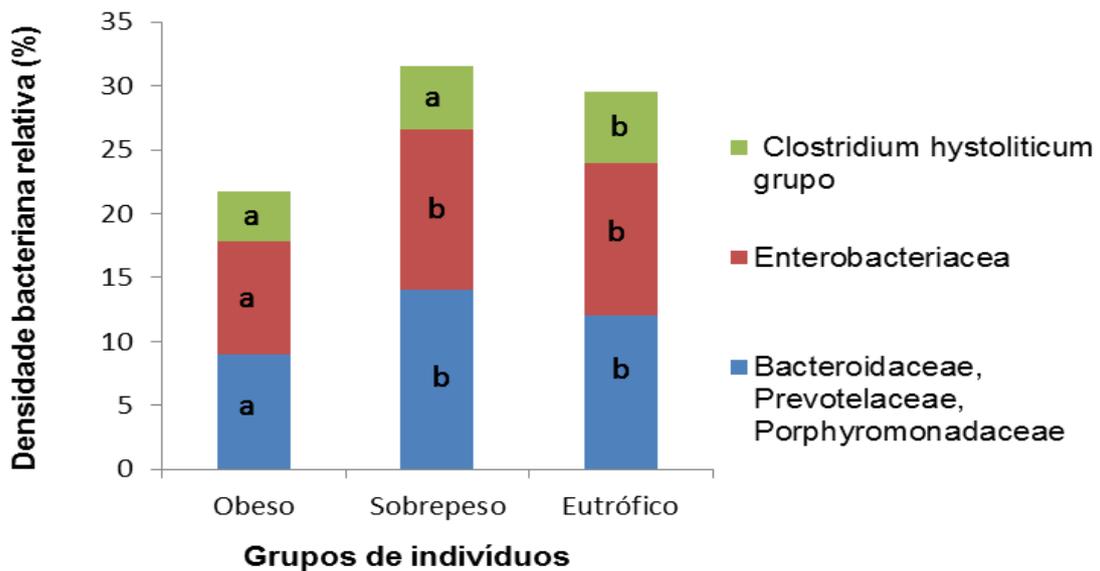


Figura 9. Densidade bacteriana relativa nos grupos estudados. Letras distintas diferem entre si a nível de significância de 95% pelo teste T de Student ( $p < 0.05$ ).

#### 5.4 Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana intestinal.

O padrão de bandeamento obtido nos experimentos de PCR-DGGE foi considerado para estimar a estrutura da comunidade bacteriana nas amostras fecais provenientes de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos.

Cada uma destas bandas de amplicon visualizado nos géis foi considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU). A quantidade de bandas detectáveis foi considerada como indicativo para avaliação de riqueza e mostrou que nos espécimes fecais avaliados a riqueza com relação ao domínio Bactéria, é semelhante entre os diferentes indivíduos, se obesos, com sobrepeso ou eutróficos (Tabela 8, Figura 10).

Tabela 8. Estatística descritiva dos resultados da variável riqueza para o domínio bactéria e valores de p entre os grupos estudados.

Parâmetros	Domínio Bactéria			Valor de P		
	Eutrófico (eu)	Sobrepeso (sob)	Obeso (ob)	$p$ (eu x sob)	$p$ (eu x ob)	$p$ (sob X ob)
Nº de Observações	24	24	24			
Mínimo de bandas	1	3	1			
Máximo de bandas	14	12	13			
Média das bandas	5,96	5,41	6,87	0,53	0,36	0,07
Desvio Padrão	3,65	2,12	3,31			

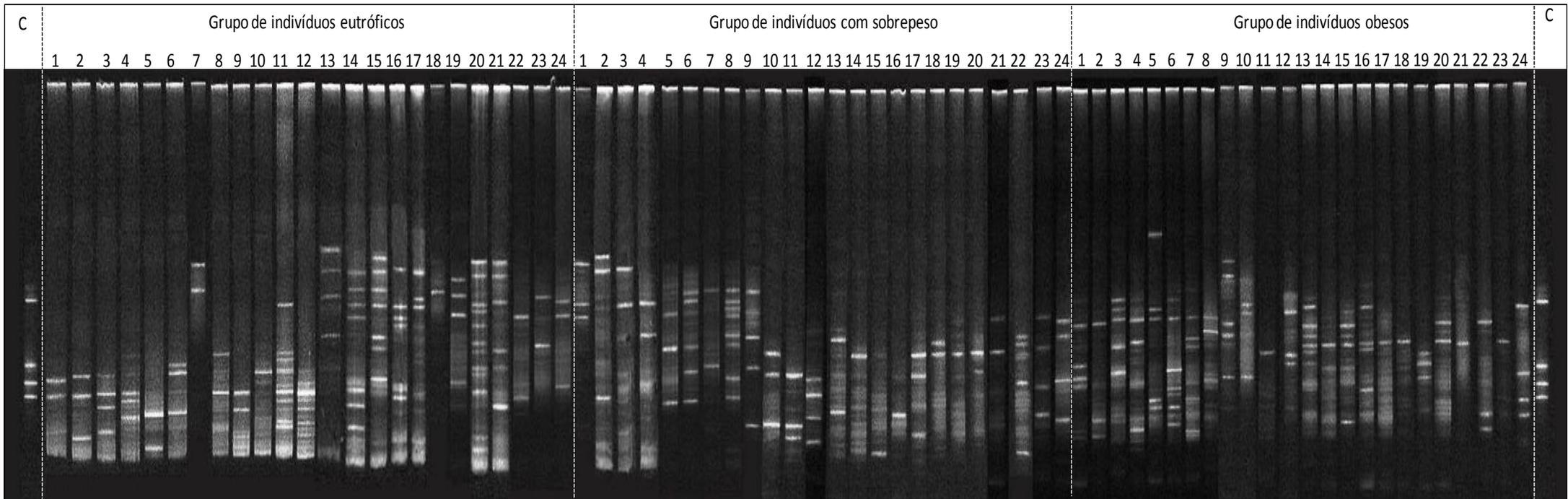


Figura 10. DGGE fingerprint dos produtos de amplificação do DNA bacteiano correspondete à região V6 do gene codificante para o RNA 16s a partir do metagenoma fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. C = controle da eletroforese em gradiente de desnaturação contendo DNA 4 espécies bacterianas.

Foram anotadas, no total, 26 bandas majoritárias diferentes, sendo 15 comuns aos três grupos de indivíduos avaliados; 6 bandas comuns entre os participantes do grupo eutrófico e com sobrepeso; 3 bandas exclusivas do grupo eutrófico e duas exclusivas do grupo obeso (Figura 11).

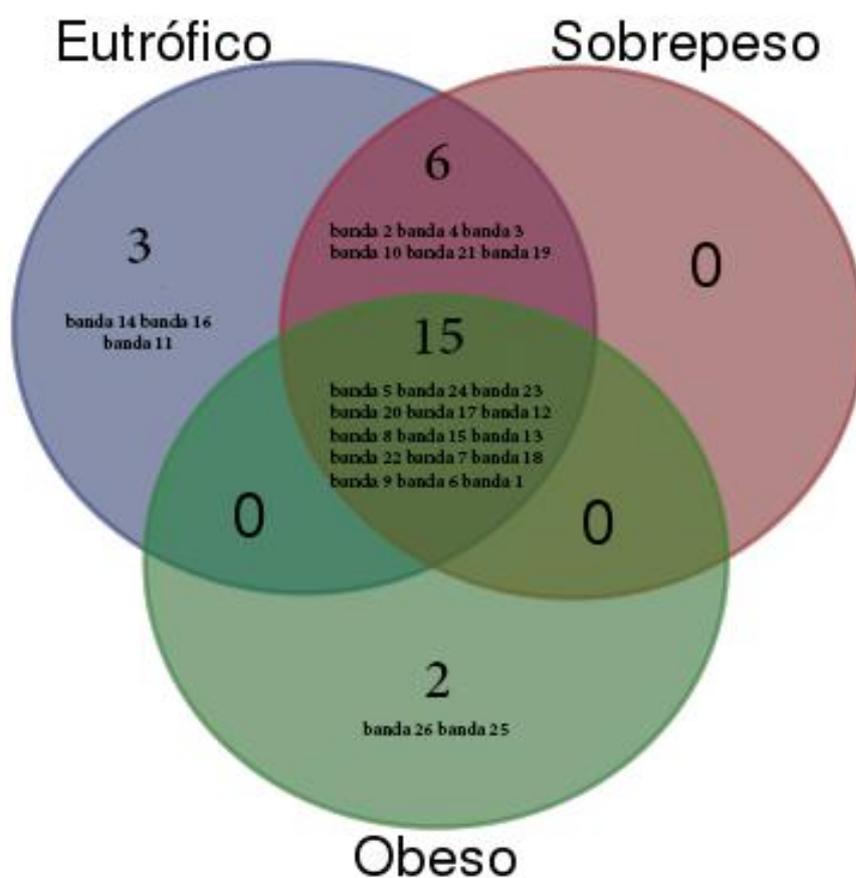


Figura 11: Diagrama de Venn com a distribuição das bandas correspondentes à região V6 do RNA16s bacteriano amplificadas a partir do DNA metagenômico extraído de amostras fecais de de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos.

A partir dos perfis de bandeamento foi construída uma matriz para presença e ausência das bandas identificadas com posterior análise por agrupamento UPGMA e geração de um dendograma de similaridade.

Os 72 indivíduos participantes deste estudo (eutróficos, com sobrepeso e obesos) foram divididos em 3 grupos distintos baseado no perfil de bandejamento (DGGE *fingerprint*) dos produtos de amplificação do DNA bacteriano correspondente à região V6 do gene codificador para o RNA 16s a partir do metagenoma fecal: C1, C2 e C3 (Figuras 12 e 13).

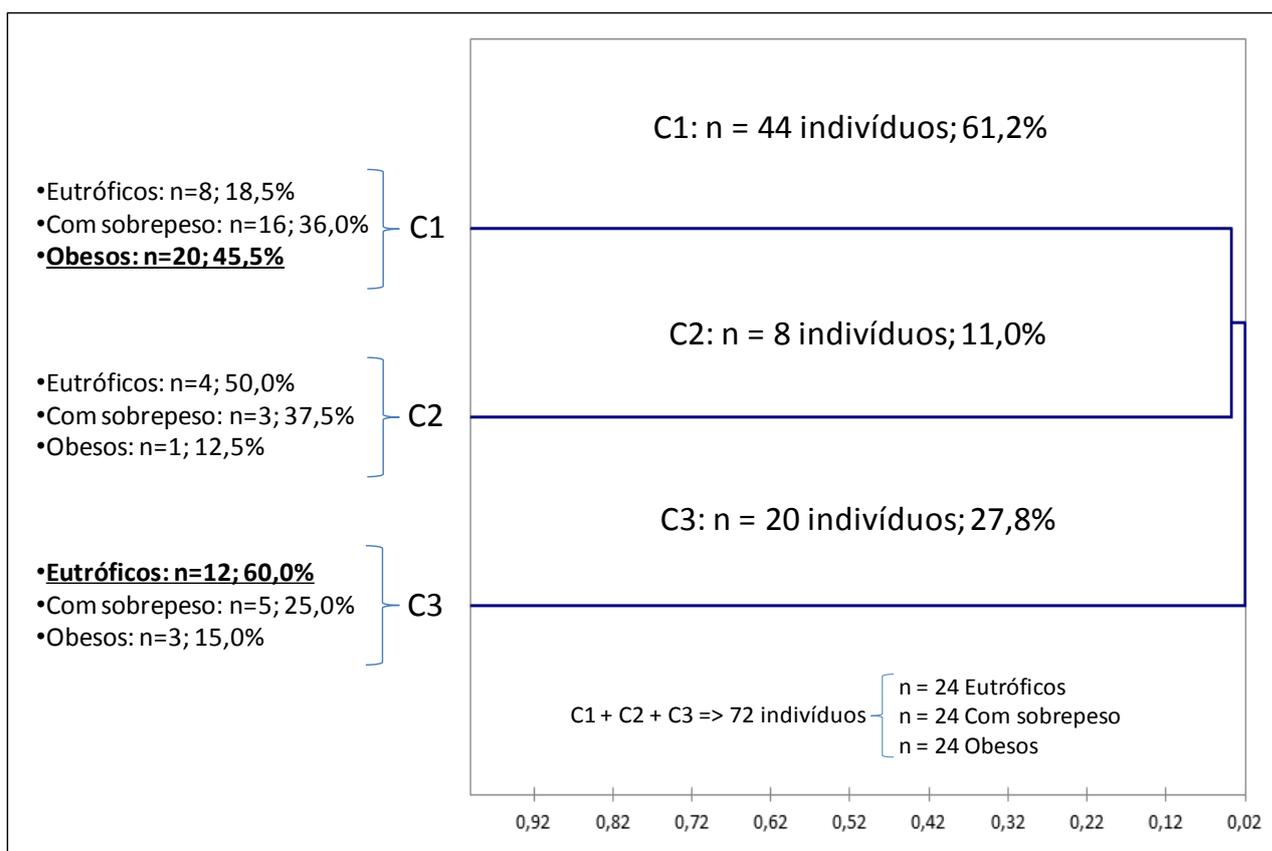


Figura 12: Agrupamento dos indivíduos participantes desse estudo (eutróficos, com sobrepeso e obesos) de acordo com o perfil de bandas correspondetes à região V6 do RNA16s bacteriano amplificadas a partir do DNA metagenômico extraído de amostras fecais separadas por DGGE.

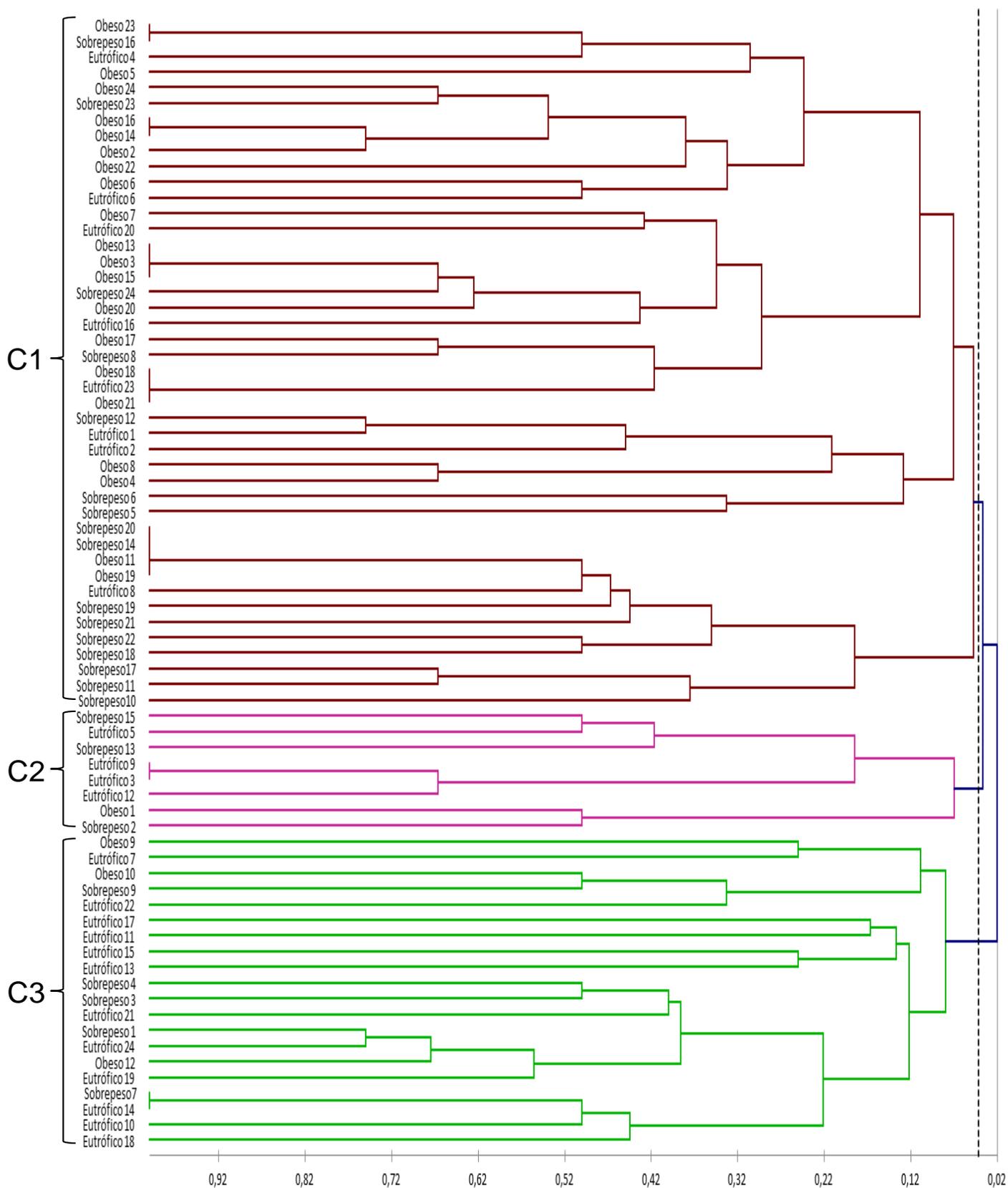


Figura 13. Matriz de similaridade resultante da análise de agrupamento UPGMA com coeficiente de Jaccard, do *finger print* dos produtos de amplificação do DNA bacteriano, separados em DGGE, correspondente à região V6 do gene codificador para o RNA16s a partir do metagenoma fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. *Bootstrap* de 1000 réplicas.

De maneira geral, considerando-se o total de indivíduos em cada grupo, n=24, C1 é composto por 83,3% dos indivíduos obesos avaliados, 66,6% dos indivíduos com sobrepeso e 33,3% dos indivíduos eutróficos; C2 é composto por 4,2% dos obesos, 12,5% dos com sobrepeso e 16,7% dos eutróficos; C3 é composto por 12,5% dos obesos, 20,8% dos sobrepesos e 50% dos eutróficos.

Por outro lado, tal como apresentado na figura 12, o grupo C1 é formado pela maioria dos participantes, 44 indivíduos, sendo 20 obesos (45,5%), 16 com sobrepeso (36%) e 08 indivíduos eutróficos (18,5%). O grupo C2, o menos representativo, é composto por 08 indivíduos sendo 01 obeso (12,5%), 03 com sobrepeso (37,5%) e 04 eutróficos (50%). O grupo C3 é composto por 20 indivíduos, dos quais 03 obesos (15%), 05 com sobrepeso (25%) e 12 eutróficos (60%).

### **5.5 Correlação da carga microbiana com dados bioquímicos e perfil nutricional e entre o aumento da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* e características dos indivíduos.**

Para avaliar a relação entre as densidades absolutas (log/g de fezes) dos grupos bacterianos frente aos parâmetros bioquímicos e antropométricos dos grupos formados pelos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, foi determinada a correlação de *Spearman* (Apêndices E, F, e G).

Considerando-se os indivíduos do grupo eutrófico, encontramos correlações negativas moderadas (-0,464 a -0,589;  $p > 0,05$ ) entre os níveis séricos de colesterol total e colesterol-LDL com Actinobacteria,  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria e  $\gamma$ -proteobacteria. Esse achado sugere uma moderada probabilidade de que um aumento nos níveis séricos de colesterol total e sua fração LDL, resulte em uma diminuição nas densidades relativas destes grupos microbianos. Além disso, a fração LDL do colesterol nestes indivíduos mostrou, também correlação negativa moderada (-0,474 a -0,477;  $p > 0,05$ ) com os filos Firmicutes e Bacteroidetes. Correlação positiva, ainda moderada (0,446,  $p = 0,033$ ) foi observada entre os níveis de Cortisol sérico com a classe  $\beta$ -proteobacteria.

Considerando-se os indivíduos do grupo obeso, encontramos uma correlação negativa moderada (-0,406 a -0,563;  $p > 0,05$ ) entre os níveis de cortisol

sérico e  $\alpha$ -proteobacteria,  $\gamma$ - proteobacteria e Bacteroidetes. Ainda, correlação positiva moderada foi observada entre os índices de IMC e Circunferência abdominal com a família *Enterobacteriaceae* (0,468 e 0,424;  $p>0,05$ ).

Não foram observadas correlação positiva ou negativa significativa entre os parâmetros enumerados e as densidades relativas dos grupos bacterianos avaliados no grupo de indivíduos categorizados com sobrepeso.

Para avaliação da correlação entre as variáveis fisiológicas e de comportamento (IMC  $>25$  Kg/m<sup>2</sup> e ingestão calórica), e bioquímicas (glicose e colesterol total), e a observação da razão *Firmicutes/Bacteroidetes*  $> 1$  (maior que um), foi determinada a razão de Odds (Tabela 9).

Foi observada correlação positiva entre os parâmetros entre IMC  $>25$ , glicose  $>100$  mg/dl e colesterol  $>200$  mg/dl, com razão *Firmicutes/Bacteroidetes*  $> 1$ . Embora os valores de correlação sejam próximos, os limites do intervalo superior sugerem uma correlação fortemente positiva.

Não foi observada correlação positiva entre o parâmetro de ingestão calórica ( $>2000$  Kcal/dia) e a razão *Firmicutes/Bacteroidetes*  $> 1$ . Neste caso, embora a correlação tenha sido  $< 1$ , o limite do intervalo superior foi próximo de 1, reforçando a ideia de correlação negativa.

Tabela 9. Correlação entre razão *Firmicutes/Bacteroidetes*  $>1$  e variáveis fisiológicas, de comportamento e bioquímicas dos indivíduos participantes.

Parâmetros avaliados	Razão de Odds (Variação)
IMC $>25$	1,96 (0,62 – 6,22)
Calorias ( $>2000$ Kcal)	0,62 (0,22 - 1,74)
Glicose ( $>100$ mg/dl)	1,80 (0,50 – 6,48)
Colesterol ( $>200$ mg/dl)	1.47 (0.52 – 4,15)

## 6. DISCUSSÃO

A obesidade é uma enfermidade de proporções mundiais associadas à comorbidades de alto impacto na saúde. Neste estudo foram avaliados 72 indivíduos, classificados e divididos em três grupos distintos: eutróficos, com sobrepeso e obesos 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 IMC. Assim, o grupo de indivíduos obesos foi formado por pessoas do sexo feminino, em sua maioria, com uma idade média de 42,7 anos, e que recebem entre 1 e 3 salários mínimos de referência no Brasil, em 2015.

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 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; FERREIRA et al., 2009; KAIN et al., 2014). Acredita-se que a obesidade está ligada à dinâmica social do indivíduo, não sendo apenas uma doença física, mas também social. O nível socioeconômico é um fator importante na prevalência da obesidade, uma vez que interfere diretamente no acesso a informações, na disponibilidade de alimentos mais saudáveis e a determinados padrões de atividade física. Assim, é aceito que o cotidiano possa moldar os hábitos alimentares dos indivíduos (FERREIRA E MAGALHÃES, 2005; OLIVEIRA, 2013). Outros autores reforçam essas observações como seus achados, sobre uma prevalência de obesidade em mulheres em detrimento aos homens, e indicam que quanto menor o índice de escolaridade e renda, maior a prevalência de excesso de peso e obesidade (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em relação às comorbidades associadas à obesidade, de acordo com os dados clínicos, neste estudo, alteração da pressão arterial (PA) é a comorbidade

mais evidentemente relacionada a 62% dos indivíduos participantes no grupo obeso (12% no grupo de indivíduos com sobrepeso e 4% no grupo de indivíduos eutróficos). É aceito que alteração da PA seja um dos distúrbios vasculares mais comuns que atingem pacientes com aumento de peso e está diretamente relacionada ao IMC, sendo sua prevalência até três vezes maior em pacientes obesos (GALVÃO e KOHLMANN, 2002).

A relação entre obesidade e diabetes tipo 2 já é bem estabelecida há vários anos, e uma das principais ligações entre essas duas enfermidades é a resistência insulínica (KAHAN e FLIER, 2000). Embora, apenas 25% da glicose circulante seja captada por órgão dependentes de insulina, qualquer desequilíbrio na captação pode levar a um quadro de intolerância à glicose e a um possível quadro de diabetes tipo 2 (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHAJUNIOR, 2003).

No nosso estudo, apesar das médias de glicose e insulina estarem dentro dos valores de referência nos três grupos de indivíduos, as médias do grupo obeso em relação ao grupo eutrófico foram significativamente maiores nos dois casos. Além disso, a média do índice HOMA-IR encontra-se dentro dos valores normais, mas também significativamente maior no grupo obeso. Esse achado reforça a ideia de que os indivíduos do grupo obeso têm uma maior tendência a uma resistência insulínica, e conseqüentemente um possível desenvolvimento de uma intolerância à glicose no futuro, o que pode levar a um quadro de Diabetes tipo 2 (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHAJUNIOR, 2003). De acordo com a literatura, esse índice HOMA-IR é calculado a partir dos valores séricos de glicose e insulina, e relacionado à resistência insulínica (BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008).

Quanto ao perfil lipídico avaliado entre os participantes desse estudo, não houve diferença com significância estatística entre as médias dos grupos nos perfis de triglicérides e colesterol total e colesterol LDL. Nossos achados concordam com dados da literatura, onde é descrita ausência de diferença no perfil lipídico de indivíduos obesos, com sobrepeso ou eutróficos (DOS SANTOS et al., 2014). O padrão de alimentação hiperlipídica e hipercalórica, típica de um padrão ocidental, está sendo assumido cada vez mais pela população brasileira. Este tipo de dieta associado a um padrão sedentário da população brasileira, entre outras causas, pode resultar em um perfil lipídico alterado na população de maneira geral (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHAJUNIOR, 2003).

O cortisol é um glicocorticoide sintetizado a partir do colesterol e com importantes efeitos no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. No obeso, sua liberação é aumentada, mas como o metabolismo desses indivíduos é aumentado, seus níveis séricos, geralmente, encontram-se dentro dos valores normais (BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008). No nosso estudo, é importante ressaltar que os valores de cortisol também estiveram dentro dos limites de referência nos três grupos de indivíduos, com diferença significativa entre aqueles dos grupos eutrófico e obeso.

Os valores de creatinina sérica e hemoglobina podem estar aumentados em pessoas obesas, porém, o aumento sérico é mais comum em pessoas do sexo masculino (BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008). Em nosso estudo, esses parâmetros encontram dentro da normalidade nos dois casos. Uma explicação para esses achados pode estar relacionada ao predomínio de indivíduos do sexo feminino, onde, a modificação desses parâmetros é mais rara de ocorrer.

Outros parâmetros hematológicos como leucometria total, porcentagem de neutrófilo e monócitos também estão dentro dos valores de referência. Sabe-se que a obesidade leva a um estado de inflamação crônica subclínica, com aumento sérico de TNF- e Il-6 e outros marcadores inflamatórios, e um acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, porém, essa inflamação de baixo grau não é suficiente para aumentar periféricamente células tipicamente inflamatórias como neutrófilos e monócitos (DE MORAES et al., 2014).

Com relação aos dados antropométricos, neste estudo, a média da circunferência da cintura e relação cintura/quadril (RCQ), circunferência abdominal e circunferência do quadril, aumentam à medida que aumenta o IMC nos indivíduos estudados. A circunferência abdominal, assim como a relação cintura/quadril são índices que auxiliam no diagnóstico da obesidade e tem relação direta com a distribuição predominantemente abdominal da gordura (característica da obesidade androide) que, por sua vez está relacionada a um risco aumentado no desenvolvimento de complicações metabólicas atribuídas à obesidade (WHO, 2000). As medidas de circunferência abdominal e quadril não possuem valores de referência documentados, mas são dados importantes na avaliação do estado nutricional dos pacientes quando associados ao IMC e a outros dados antropométricos (REZENDE et al., 2010).

A microbiota intestinal humana (MIH) pode ser facilmente modulada pela alimentação. Dessa forma, adotar uma alimentação balanceada saudável no dia a dia é uma forma de prevenir ou até mesmo intervir de maneira positiva em algum distúrbio previamente instalado, como a obesidade (DORÉ; BLOTTIÈRE, 2015).

Em nosso estudo, o consumo de macronutrientes está de acordo com o esperado para a região sudeste do país (ARAUJO et al., 2013). O consumo de calorias e carboidratos foi maior pelos indivíduos obesos em comparação com aqueles categorizados no grupo eutrófico. O consumo de lipídeos e proteínas foi semelhante nos três grupos. Por fim, o consumo de fibras pelo grupo obeso foi estatisticamente maior quando comparado ao grupo de eutróficos.

Observa-se um consumo calórico e de carboidratos crescente entre os grupos. Dados da última pesquisa de orçamento familiar no Brasil, demonstraram que a dieta da nossa população é baseada nos alimentos tradicionais como arroz e feijão, porém é rica em alimentos altamente energéticos e com baixo teor de nutrientes, ricos em açúcar e gorduras saturadas e pobres em fibras (JAIME et al., 2011). Estudo desenvolvido por Levy-costa e colaboradores em 2005, mostrou que a porcentagem de sacarose da fração de carboidratos ingerida pelos brasileiros (13,7%) é maior do que o limite máximo recomendado (10%). Sabe-se que os carboidratos simples influenciam no índice glicêmico, que por sua vez estimula a lipogênese, aumentando o tamanho dos adipócitos. Assim, o índice glicêmico dos carboidratos é importante, pois pode induzir à obesidade e outras doenças relacionadas. O desequilíbrio na alimentação associado a outros fatores pode levar ao fenótipo obeso, por isso é de se esperar que pessoas obesas tenham uma alimentação, do ponto de vista nutricional, inferior às pessoas na faixa correta de peso (ROSADO e MONTEIRO, 2001).

Ainda, no nosso estudo, o consumo de macronutrientes e fibras encontram-se dentro dos valores de referência em todos os grupos de indivíduos avaliados, porém a necessidade diária de calorias que devem ser ingeridas é característica individual. Como os valores de macronutrientes são dados em porcentagem de calorias fornecida pela dieta, se o consumo de calorias for acima ou abaixo da quantidade recomendada, os macronutrientes estudados podem estar sendo consumido em excesso ou em quantidades menores. O apêndice B mostra a quantidade real de calorias ingeridas por cada indivíduo, de acordo com o

questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA) aplicado, e a quantidade recomendada para os indivíduos nas categorias com sobrepeso, obesos e eutróficos. Surpreendentemente, 79,2% dos indivíduos do grupo obeso e 58,3% daqueles com sobrepeso consomem menos calorias do que o recomendado diariamente com base nos cálculos de EER, refletindo, dessa forma, nos valores de macronutrientes.

Segundo Bernardi, Cichelero e Vitolo, 2005 é muito difícil mensurar a quantidade de calorias ingeridas por um indivíduo, principalmente porque pacientes obesos tendem a informar valores de ingestão de energia fisiologicamente improváveis. Esse sub-relato alimentar ocorre principalmente com alimentos de alta densidade calórica e decorre, principalmente, de uma pressão social e cultural para manter hábitos alimentares saudáveis e corpo em forma (LUTOMSKI et al., 2009; VENTURINI et al, 2013).

Não foi observada diferença significativa na qualidade dos alimentos consumidos pelos diferentes indivíduos participantes dos diferentes grupos. Monteiro et al., 2015, em seu estudo para avaliar o impacto que os alimentos ultraprocessados exercem sobre o perfil nutricional da dieta no Brasil, mostrou que a média calórica diária consumida pela população adulta brasileira foi de 1866 Kcal, sendo 69,5% provenientes de alimentos *in natura* ou minimamente processados, 9% de alimentos processados e 21,5% de alimentos ultraprocessados. No nosso grupo amostral encontramos uma porcentagem menor da contribuição para ingestão calórica pelos alimentos *in natura* ou minimamente processados (51,9% nos eutróficos, 52,8% com sobrepeso e 52,2% nos obesos), porém encontramos uma contribuição bem maior dos alimentos processados. (25% nos eutróficos, 24,6% com sobrepeso e 26,1% nos obesos). A porcentagem dos alimentos ultraprocessados encontra-se bem próxima ao do estudo feito por Monteiro et al., 2015 para a população brasileira.

Levy-Costa et al., 2005 mostrou um aumento de 400% no consumo de produtos industrializados na população brasileira de maneira geral. O crescente consumo de produtos processados e ultraprocessados são tidos como uma das causas do aumento da obesidade no Brasil (MOUBARAC e MONTEIRO 2013). Esses alimentos possuem maior densidade energética, maior quantidade de açúcar livre e menor teor de fibras em relação aos alimentos *in natura* ou minimamente

processados, além de conter uma grande quantidade de conservantes, de maneira a aumentar seu tempo de prateleira (Monteiro et al, 2015). Como exemplo de conservantes temos: sulfitos, benzoatos, sorbatos. Parabenos, nisina, diacetato de sódio, nitrito de sódio, entre outros. Essas substâncias são ativas contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SAUCEDA, 2011). É possível que estes conservantes causem implicações na MIH.

O culto ao corpo associado a uma grande disponibilidade de dietas da moda disponíveis em revistas e sites não científicos e, o fácil acesso da população a esse tipo de informação, tem instigado uma adesão, principalmente do gênero feminino, cada vez maior a esse tipo de dieta. Estudos feitos no Brasil mostraram que essas dietas, muita vezes, se tornam inadequadas no que se refere à composição de macronutrientes para uma perda de peso saudável e não levam em consideração as características nutricionais individuais, podendo, desse modo, refletir também nos resultados de consumo de macronutrientes (LIMA et al., 2015).

Devido à sua etiologia multifatorial, torna-se, também, complicado mensurar as forças de cada variável envolvida no processo da obesidade (Cichelero e Vitolo, 2005).

Nos últimos anos tem-se discutido bastante a importância da MIH no processo saúde-doença. A relação entre a MIH e a obesidade tem sido foco de intenso estudo, e as proporções dos Filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* parecem desempenhar um importante papel nesse processo (SCHWIERTZ et al., 2010). Os dois filos dominam a MIH, e a proporção entre eles depende do habitat intestinal. De maneira ainda desconhecida, o intestino de pessoas obesas parece favorecer o aumento de *Firmicutes* (PISTELLI; MAREZE-DA-COSTA, 2010).

Dezesseis diferentes sondas foram utilizadas nesse estudo, para quantificação relativa da densidade de grupos bacterianos determinados em relação à densidade bacteriana total nos espécimes fecais dos indivíduos distribuídos entre os três grupos de estudo: eutróficos, com sobrepeso e obesos. Entre os microrganismos avaliados destacam-se aqueles representativos dos principais grupos bacterianos encontrados na MIH: família *Bacteroidaceae*, pertencente ao Filo *Bacteroidetes*; *Enterobacteroidaceae*, pertencente às  $\gamma$ -*proteobacterias*, respectivamente, e o grupo *Clostridium Hystoliticum* pertencente

ao Filo *Firmicutes* (VRIEZE et al., 2010). Alterações nesses grupos bacterianos têm sido relatadas na microbiota de indivíduos obesos (NADAL et al., 2009).

Em nosso estudo, a densidade relativa de *Firmicutes* nos obesos foi menor comparada aos eutróficos, assim como a densidade relativa de *Bacteroidetes*, porém a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* é maior no grupo de obesos, indicando um aumento relativo da proporção de *Firmicutes* nesses indivíduos. O aumento da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* é bem relatado na literatura, tanto em modelo animal, quanto em humanos (LEY et al., 2005; LEY et al., 2006). O aumento relativo de *Firmicutes* pode contribuir com uma extração de energia e geração de AGCC mais eficaz a partir da dieta. Porém, outros trabalhos não indicaram essa mudança, sugerindo que ela não ocorra de maneira sistemática (SCHWIERTZ et al., 2010). Alguns estudos sugerem, entretanto, que uma dieta rica em gordura, e não o estado de obesidade por si só, leva a um aumento de *Firmicutes* e uma diminuição proporcional de *Bacteroidetes*, destacando a importância da modulação da dieta na MIH (HILDEBRANDT et al., 2009).

O filo *Verrucomicrobia*, a classe  $\gamma$ -*proteobacteria*, as famílias *Bacteroidaceae* e *Enterobacteroidaceae* e o grupo *Clostridium Hystoliticum* também se encontram diminuídos no grupo obeso quando comparado ao eutrófico. Possivelmente a menor proporção desses grupos está sendo compensados por outros grupos de microrganismos, bacterianos ou não (fungos e Archeas) não estudados, uma vez que a densidade microbiana total não variou entre os três grupos estudados.

O filo *Firmicutes* é composto por bactérias gram-positivas, possuem três classes, incluindo um total de 235 gêneros e todas as espécies são bactérias do ácido láctico. Os membros desse filo possuem uma alta diversidade morfológica, fisiológica (HAAKENSEN et al., 2008). O filo *Bacteroidetes* é composto por quatro grandes classes de bactérias gram-negativas, representando cerca de 7000 espécies diferentes. Colonizam diversos sítios incluindo o TGI onde desempenham diversas funções biológicas (THOMAS et al., 2011).

*Firmicutes* e *Bacteroidetes* compreendem até 90% do total de microrganismos na MIH, seguida por *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. Esses filios formam um núcleo microbiano comum a todos os indivíduos adultos (SHIN, WON, BAE, 2015).

Estudos indicam uma proporção do filo *Proteobacteria* aumentada em pessoas com distúrbios metabólicos, como a obesidade (SHIN, WON, BAE, 2015). Segundo Fei e Zhao, 2012 essas bactérias mostraram um potencial obesogênico em estudo desenvolvido em camundongos *germ-free* em monoassociação com *Enterobacter Cloacae*. A diminuição gradual de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foi demonstrada em obesos mórbidos que foram submetidos à dieta (SHIN, WON, BAE, 2015). Em nosso estudo não observamos esse aumento, porém, o Filo *Proteobacteria* é composto por 6 classes (*alfa, beta, gama, delta, teta e Epsilonproteobactérias*), das quais apenas 3 foram avaliadas (COSTELLO et al., 2009). Outro motivo para encontrarmos uma proporção menor, pode ser associado ao fato de que as proteobactérias são encontradas em maiores quantidades associadas à mucosa intestinal do que nas fezes (fração luminal) (SHIN, WON, BAE, 2015).

Estudo desenvolvido por Turnbaugh et al., 2009b, demonstrou uma diminuição de *Bacteroidetes* e um aumento de *Actinobacteria* em pessoas obesas. Em nosso estudo, o aumento de *Actinobactéria* foi significativo apenas nos indivíduos com sobrepeso em relação aos indivíduos eutróficos. O Filo *Actinobactéria* é o terceiro maior em quantidade na MIH (LOPEZ-CEPERO, PALACIOS, 2015). Actinobactérias são bactérias gram-positivas com alto conteúdo G+C (Guanina – citosina) podendo exceder 70% do total dos nucleotídeos, possuem grande variedade morfológica e diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, como a produção de antibióticos (LACAZ et al., 2002).

Em um panorama geral, o grupo com sobrepeso encontra-se em um meio termo entre eutrófico e obeso, indicando um possível processo de modificação da MIH com o ganho de peso. Nossos resultados sugerem uma modificação da MIH no processo de obesidade, porém é importante ressaltar que a diferença nas metodologias, no número amostral e no tratamento e análise das amostras, dificulta a comparação entre os estudos e a generalização dos resultados obtidos (DE MORAES et al., 2014). É importante lembrar também que existe uma grande variedade qualitativa interpessoal em nível de gênero e espécie, como resultado de interferência de fatores genéticos e ambientais (ISMAIL et al., 2011).

A literatura aponta como as principais fragilidades metodológicas nos estudos de associação entre microbiota e obesidade, o universo amostral que varia

entre 3 e 12 indivíduos, além das metodologias analíticas que não levam em consideração as condições clínicas e nutricionais dos participantes (TAGLIABUE e ELLI, 2013). Além disso, os estudos de ecologia microbiana exigem metodologias independentes de cultivo que resultam em diferentes níveis de informação. Assim, é sugerido a associação de informações clínicas e nutricionais de grupos amostrais mais amplos, como proposto neste estudo, além da associação de metodologias de análise, para que uma abordagem possa ser sustentada por outras metodologias (MAI et al., 2009).

Para este estudo, duas metodologias foram propostas, o PCR-DGGE e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A metodologia de FISH tem como limitador a cobertura das sondas utilizadas, especialmente as sondas para as classes  $\beta$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria*, e filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, as quais possuem especificidade para uma ampla parcela de gêneros e espécies. Apesar disso, podem não ser capazes de hibridizar a totalidade dos táxons contemplados por esses grupos taxonômicos (MANZ, et al., 1992; MEIER, et al., 1999). Dessa forma, acredita-se que nem todas as espécies e gêneros pertencentes aos grupos analisados puderam ser amostradas. Ainda, sobre a técnica de FISH, embora se proceda a diluições seriadas a partir do espécime analítico inicial, a complexidade da amostra analisada também pode resultar em interferências, como por exemplo, a grande quantidade de microrganismos presente nas fezes pode aumentar o erro durante a contagem dos híbridos fluorescentes (FRANKS et al., 1998).

Por outro lado, nesse estudo a diversidade bacteriana da microbiota intestinal dos indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos foram investigadas também pela técnica de PCR-DGGE. Como relatado anteriormente, a informação gerada, embora diferente, permite corroborar os achados de variação na estrutura da comunidade bacteriana nos indivíduos avaliados. Nesta abordagem metodológica, o número de bandas visualizadas nos géis permitem a inferência de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Porém, a técnica também apresenta limitações, uma vez que apenas fragmentos de até 500pb podem ser bem separados na trama no gel de poliacrilamida nas condições experimentais (FROMIN et al., 2002). Além disso, regiões que se caracterizam apenas por pequenas variações de sequência de aminoácidos, também não podem ser separadas pelo DGGE (YU; MORRISON, 2004). A técnica detecta apenas grupos

ou espécies dominantes e, alguns estudos demonstraram que a população detectada no gel pode chegar a menos de 1 % da população total. (FROMIN et al., 2002). Outros fatores, como a região V utilizada na amplificação e o método de extração do DNA, também irá influenciar na detecção das bandas (YU; MORRISON, 2004). Apesar desse quadro, o DGGE é atualmente uma das técnicas que permitem comparações visuais reprodutíveis de perfis de comunidades microbianas e, tem sido aplicada com sucesso a uma grande variedade de estudos de ecossistemas microbianos (WU et al., 2010).

A análise de agrupamento dos *fingerprints* de DGGE revelou a presença de três grupos (*clusters*) diferentes na população amostrada. Um *cluster* é definido como um agrupamento de elementos semelhantes (NETO; MOITA, 2007). Assim, observa-se a presença de um agrupamento dominante formado principalmente por pessoas obesas e com sobrepeso, sugerindo um perfil de OTUs predominantemente na microbiota intestinal dos indivíduos obesos, sobreposição àquela provavelmente encontrada em muitos indivíduos com sobrepeso. Observa-se, ainda, que dentro de um mesmo *cluster*, indivíduos que fazem parte da mesma categoria (obesos, com sobrepeso e eutróficos) tendem a se manter mais próximos, ou seja, são mais semelhantes entre si.

Por outro lado, a técnica de PCR-DGGE permitiu a formação de um *cluster* cuja predominância foi de indivíduos eutróficos, associados a indivíduos com sobrepeso, que, como já relatado podem ter apresentado sobreposição da estrutura da comunidade microbiana àquela provavelmente encontrada em muitos indivíduos eutróficos.

Um terceiro cluster com menor representatividade foi identificado, ainda com predominância de indivíduos eutróficos e com sobrepeso que se caracterizam por uma estrutura de comunidade microbiana intestinal intermediária aos clusters de predominância de obesos e de predominância de eutróficos. A falta de estudos na literatura que categorizam os participantes em obesos, com sobrepeso e eutróficos, limita nossa discussão sobre o papel da dinâmica da microbiota intestinal durante o processo de obesidade (LEY, TURNBAUGH, 2006; DUNCAN et al., 2008; MAI et al., 2009)

Apesar de estar clara a maior similaridade entre indivíduos obesos e com sobrepeso pela análise de agrupamento, não encontramos diferença estatística

para a variável riqueza (número de bandas ou OTUs) entre os três grupos em relação ao domínio Bactéria, sugerindo que a obesidade está relacionada, no grupo de indivíduos amostrados, com uma modificação na MIH e não com a ação de um grupo microbiano específico, como já relatado (WU et al., 2010). Além disso, a técnica de PCR-DGGE permite a detecção de grupos dominantes, não sendo sensível para determinação da diversidade total da amostra, mas sim, quando pertinente, permite uma medida relativa da diversidade total para comparação de amostras (WU et al., 2010). A utilização de marcadores específicos para determinados grupos microbianos permitiria uma análise detalhada por PCR-DGGE de grupos específicos para uma melhor compreensão de como a estrutura da MIH é modificada em pessoas obesas e com sobrepeso.

Nas análises de associação entre as variáveis deste estudo, observou-se correlação negativa entre colesterol total e colesterol-LDL com o filo *Actinobacteria* e com as classes  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\gamma$ -*proteobacteria*. Além disso, foi observada, ainda, correlação negativa entre colesterol LDL com *Firmicutes* e *Bacteroidetes* no grupo dos eutróficos. Essa correlação não foi observada nos outros grupos estudados, assim como a correlação negativa do cortisol com  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\gamma$ -*proteobacteria* e *Bacteroidetes* no grupo obeso e a correlação positiva entre o cortisol e  $\beta$ -*Proteobacteria* no grupo eutrófico. Essas permitem sugerir que a MIH possa se modular, ou ser modulada de maneira distinta frente às diferentes variáveis, segundo o ambiente intestinal que ela se encontra.

Parâmetros como IMC > 25; glicose sérica >100 mg/dl; colesterol total > 200 mg/dl; consumo de calorias > 2000kcal diários foram escolhidos para análise de relação com a modificação na relação entre *Firmicutes* /*Bacteroidetes*. IMC > 25 foi escolhido por caracterizar indivíduos com sobrepeso e obesidade (WHO, 1995). Os demais parâmetros foram selecionados por representarem alterações importantes presentes nesses indivíduos.

As análises mostraram uma correlação positiva entre IMC, glicose sérica e colesterol total com o aumento da relação *Firmicutes*/*Bacteroidetes*. Estes resultados sugerem uma inter-relação entre o excesso de peso e o aumento relativo do filo *Firmicutes* em relação ao filo *Bacteroidetes* o qual poderia estar relacionada com o processo de obesidade. Embora os 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 bioquímicas e o aumento da razão *Firmicutes* /*Bacteroidetes*.

De maneira geral, percebe-se que a influência fisiológica da MIH no processo saúde-doença ainda requer estudos mais aprofundados, mas a noção de que a MIH de pessoas obesas é típica, pode ser mostrada neste estudo. A associação de abordagens metodológicas, a despeito de suas limitações, pode gerar uma informação mais consistente e reprodutível como observado neste estudo. Ainda, tamanho do universo amostral e a estratificação dos participantes em grupos mais amplos do que aqueles apontados na literatura permite uma compreensão mais ampla do fenômeno, com grande caráter regional, dado à natureza comportamental dos indivíduos.

## 7. CONCLUSÕES

- Renda baixa e pouca escolaridade figuram como características fortemente associadas aos indivíduos obesos estudados.
- Alteração de pressão arterial figura como a principal comorbidade nos indivíduos obesos amostrados, tal como apontado na literatura;
- Glicose, insulina e HDL-colesterol são os parâmetros bioquímicos mais frequentemente alterados na obesidade na nossa região;
- A circunferência abdominal, a circunferência da cintura e a relação cintura/quadril, juntamente com a determinação do IMC são marcadores complementares mensuráveis de obesidade;
- Embora exista um aumento da relação Firmicutes/Bacteroidetes nos obesos amostrados, essa condição pode ocorrer em indivíduos eutróficos e com sobrepeso; Porém uma relação maior que 1 foi encontrada com uma frequência bem superior em obesos.
- Uma maior semelhança entre os indivíduos obesos e sobrepeso foi observada pela análise de agrupamento com a formação de um *cluster* predominante, porém um segundo cluster revelou semelhança entre alguns indivíduos com sobrepeso e eutróficos.
- Indivíduos com sobrepeso comportam-se de maneira altamente heterogênea apresentando uma estrutura de microbiota intestinal intermediária ora mais semelhante aos obesos e ora mais semelhante aos eutróficos;
- A correlação entre a estrutura da microbiota intestinal com parâmetros bioquímicos antropométricos não ocorre de maneira uniforme entre os grupos de indivíduos, e não deve ser preditivo de determinada modificação na estrutura da comunidade microbiana.

## REFERÊNCIAS

AAGAARD, K., MA, J., ANTONY, K. M., GANU, R., PETROSINO, J., & VERSALOVIC, J. The placenta harbors a unique microbiome. **Science translational medicine**, v.6, n. 237, P. 237-265, 2014.

ALFENAS, R. C. G. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 5, p. 1408-1414, 2012.

ALMEIDA, R. N. A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de método molecular baseado na análise do rRNA para a identificação das bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na superfície de membranas de osmose reversa**. 2009. Tese de Doutorado. Instituto Butantan.

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

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; FERNANDES, G.; R.; TAP, J.; BRULS, T...; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. **nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANT, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. V.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. J. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BAHIA, L.; COUTINHO, E. S. F.; BARUFALDI, L. A. ABREU, G. A. The costs of overweight and obesity related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**. V. 12, n. 440, 2012. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/440>. Acesso em: 20 set. 2014.

BALISTRERI, C.R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 19 p., may. 2010.

BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, M. R. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Revista de nutrição**, v. 18, n. 1, p. 85-93, fev. 2005.

BLACKWOOD, C.B.; OAKS, A.; BUYER, J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 10, p.6193-6198, out. 2005.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G., 2000. The odds ratio, statistics notes. **Br Med J**, v. 320, p.1468, 2000.

BÖCKELMANN, U.; MANZ, N.; NEU, T. R.; SZEWZYK, U. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of

Germany by cultivation and molecular methods. **FEMS microbiology ecology**, v. 33, n. 2, p. 157-170, jan. 2000.

BORGES, N. Determinantes da epidemiologia mundial da obesidade. **Cadernos de saúde- número especial obesidade**, v. 4, p.11-13, Universidade católica Portuguesa, 2011.

BOSELLO, O.; ZAMBONI, M. Visceral obesity and metabolic syndrome. **Obesity Reviews.**, v. 1, p. 47-56, may. 2000.

BRAGA DA CRUZ, S. E. **Análise biomolecular de comunidades microbianas subgingivais associadas às periodontites crônica e agressiva generalizadas**. 2010. Tese de doutorado. Universidade federal de campinas. Faculdade de Odontologia.

BRANDT, K. G; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**, São Paulo, n. 28, v. 2, p. 117-127, jun. 2006.

BRASIL, Ministério da saúde. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília, 2015.

BURTIS, C. A.; ASHOOD, E., R. BRUNS, E. **TIETZ Fundamentos de Química Clínica**. Tradução da 6ª edição, St. Louis, editora: Elsevier, 2008.

CABALLERO B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiology Reviews**. v. 29, p.1-5, apr. 2007.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELME, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIERES, J.; TANTI, J.; GIBSON, G.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C.; BURCELIN, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, jun. 2007.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p. 729–734, set. 2007.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 13, p. 1546-1558, 2009.

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, v. 16, n.1, p.107-114, jan-mar, 2000.

CARVALHO, I. I. R. **Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, ago. 2012.

CORREA-DE-SANTANA, E.; PAEZ-PEREDA, M.; THEODOROPOULOU, M.; RENNER, U.; STALLA, J.; STALLA, G. K.; SAVINO, W. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi*-infected mammosomatotrophic cells. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 208-212, 2008.

COSTELLO, E.K.; LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J.I.; KNIGHT, R.. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, n.5960, p.1694-1697. 2009.

DAIMS, H.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematics and Applied Microbiology**, v. 22, p. 434-444, sep. 1999.

DARDENNE, M.; SMANIOTTO, S.; MELLO-COELHO, V.; VILLA-VERDE, D. M. S.; SAVINO, W. Growth hormone modulates migration of developing T cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n. 1, p. 1-5, abr. 2009.

DAVE, M.; HIGGINS, P. D.; MIDDHA, S.; RIOUX, P. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 246-257, jun. 2012.

DAS, U. N. Is obesity an inflammatory condition?. **Nutrition**, v. 17, n. 11, p. 953-966, mar. 2001.

DE GREGORIS, T. B.; ALDRED, N.; CLARE, A. S.; BURGESS, I. G. Improvement of phylum-and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 3, p. 351-356, 2011.

DE MORAES, A.C.F., DA SILVA, I.T., DE ALMEIDA-PITITTO, B. AND FERREIRA, S.R.G.. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, V.58, n.4, p. 317-327, jan., 2014.

DEVARAJ, S.; HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 4, p. 617-628, feb. 2013.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual review of nutrition**, v. 31, p. 15-31, aug. 2011.

DIBASE, J. K.; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.;DECKER, G. A.; RITTMANN, B. Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. **Mayo Clinic Proceedings**. V. 83, N. 4, P.460-69, april 2008.

DOS SANTOS, A.R.; DE ALMEIDA ALMEIDA, N.V.; GOMES, C.M.; COSTA, S.H.N.; PENNA, K.G.B.D., 2014. Estudo Comparativo Entre os Parâmetros do

Perfil Lipídico e IMC em Pacientes Atendidos no Laboratório Clínico da PUC Goiás. **Estudos**, v. 41, n. 3, p. 515-523, jul./set, 2014.

DOS SANTOS, G. F. O. **Aplicação da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para detecção de *bacillus spp.*** 2011. Dissertação de mestrado. Universidade federal de Viçosa. Faculdade de Ciências Biológicas.

DORÉ, J.; BLOTTIÈRE, H.. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. **Current opinion in biotechnology**, V. 32, p.195-199, 2015.

DUNCAN, S.H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International journal of obesity**, v. 32, n. 11, p. 1720-1724, Sep. 2008.

EIKELBOOM, D. H. Filamentous organisms observed in activated sludge. **Water Research**, v. 9, n. 4, p. 365-388, 1975.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of microbiological methods**, v. 56, n. 3, p. 297-314, mar. 2004.

EVERARD, A.; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 73-83, jan. 2013.

FARÍAS, M. M.; SILVA, C.; ROZOWSKI, J.. Microbiota intestinal: Rol en obesidad. **Revista chilena de nutrición**, v. 38, n. 2, p. 228-233, jun. 2011.

FEI, N. AND ZHAO, L.. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in *germ free* mice. **The ISME journal**, v. 7, n. 4, p.880-884, 2012.

FERREIRA, F.B.; DA SILVA FRAGA, J.C.; NUNES, J.P.; LIBERALI, R.; NAVARRO, F.. Alterações antropométricas de pacientes obesos submetidos a um tratamento multidisciplinar na obesidade em Porto Alegre. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, n. 3 v.16, p. 290-297, jul/ago, 2009.

FERREIRA, V.A.; MAGALHÃES, R.. Obesidade e pobreza: o aparente paradoxo. Um estudo com mulheres da Favela da Rocinha, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, n.21, v.6, p. 1792-1800, dez. 2005.

FLINT, H. J. Obesity and the gut microbiota. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, p. S128-S132, 2011.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P.. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environmental Microbiology**, n. 4, v.11, p.634-643, 2002.

FONTAINE, K. R.; BAROFSKY, I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity Reviews**. v. 2, p. 173-182, aug. 2001.

FRANCISCHI, R. P. P.; PEREIRA, L. O.; FREITAS, C. S.; SANTOS; VIEIRA, P. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 17-28, jan./abr., 2000.

FRANKS, A. H.; HARMSSEN, H. J. M.; RAANGS, G. C.; JANSEN, G. J., SCHUT, F.; WELLING, G. W. Variation of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16s rRNA oligonucleotide probe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3336-3345, sep. 1998.

FRIEDRICH, U.; LANGENHOVE, K.LIPSKI, A. Microbial community and physicochemical analyses of a n industrial wast gas biofilter and desing of 16s rRNA-targeting oligonucleotide probe. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 183-201, feb. 2003.

GALVÃO, R; KOHLMANN, O. J. Hipertensão arterial no paciente obeso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9, n. 3, p. 262-7, jun. 2002.

GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.91-102, jan. 2006.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 1, p. 1-20, 2006.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. Annu. **Reviews Immunology**. N. 29, p, 415-445, jan. 2011.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C.M.; DENEER, H.; ZIOLA, B.. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. **International journal of food microbiology**, v. 125, n.3, p.236-241, 2008.

HILDEBRANDT, M.A.; HOFFMANN, C.; SHERRILL-MIX, S.A.; KEILBAUGH, S.A.; HAMADY, M.; CHEN, Y.Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R.S.; BUSHMAN, F.; WU, G.D.. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v.137, n.5, p.1716-1724, 2009.

HERDER, C.; SCHNEITLER, S.; RATHMANN, W.; HAASTERT, B.; SCHNEITLER, H.; WINKLER, H.; BREDAHL, R.; HAHNLOSER, E.; MARTIN, S. Low-grade, obesity, and insulin resistance in adolescents. **The Journal of Clinical and Endocrinoly & Metabolism.**, v.92, p. 4569-4574, jul. 2013.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n. 8, p. 3233-3241, ago. 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 1721, p. 860-867, dec., 2006.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty acids, Cholesterol, Protein and Aminoacids**. Washington, DC: National Academic Press, 2005.

ISMAIL, N.A.; RAGAB, S.H.; ELBAKY, A.A.; SHOEIB, A.R.; ALHOSARY, Y.; FEKRY, D.. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Arch Med Sci**, n. 7, v. 3, p.501-507I, jun. 2011.

JAIME, P. C.; SILVA, A. C. F.; LIMA, A. M., C.; BORTOLINI, G. A. Ações de alimentação e nutrição na atenção básica: a experiência de organização no Governo Brasileiro. **Revista de nutrição**, v. 24, n. 6, p. 809-824, dec. 2011.

KAHAN, B.B.; FLIER, J.S., 2000. Obesity and insulin resistance. **Journal of clinical investigation**, n. 106 v. 4, p.473-481, aug. 2000.

KAIN, J.; CORDERO, S. H.; PINEDA, D.; MORAES, A., F.; ANTIPOSTA, D. COLLESE, T.; FORKERT, E. C. O.; GONZALEZ, L.; MIRANDA, J. J.; RIVERA, J. Obesity Prevention in Latin America. **Current obesity Reports**, V. 3 P. 150–155, mar. 2014.

KORECKA, A.; ARELAMPALAM, V. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator?, **Journal of oral microbiology**, v. 4, jan. 2012.

KYSELKOVA, M.; KOPECKY, J.; FRAPOLLI, M.; DEFAGO, G.; SAGOVA-MARECKOVA, M.; GRUNDMANN, G. L.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Comparison in soil suppressive or conductive to tobacco black root rot disease. **ISME Journal**. v. 3, p. 1127-38, 2009.

LACAZ, C. S. ; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C. ; HEINS-VACCARI, E. M. ; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LAGE, D. G.; BRITO, G. A. P. A Relação Da Microbiota Intestinal Com Obesidade E Resistência À Insulina. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.6, n.31, p.31-34, Jan/Fev. 2012.

LAM, Q. L.; LU, L. Role of leptin in immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1-13, set. 2007.

LANGENDIJK, P.; SCHUT, F.; JANSEN, G. J.; RAANGS, G. C.; KAMPHUIS, G. R.; WILKINSON, M. H. F. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 3069-3075, Aug. 1995.

LEVY-COSTA, R.B.; SICHIERI, R.; PONTES, N.D.S.; MONTEIRO, C.A., 2005. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Rev Saúde Pública**, v. 39, n.4, p.530-540, 2005.

LEY, R.E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I.. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102 n.31, p.11070-11075, jun 2005.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444 n.7122, p.1022-1023,nov. 2006.

LIMA, A.V L., FERNANDES, C.D.M.F.F., SALES, B.R.O., LIMA, M.E.R.. Teor Calórico e de macronutrientes de dietas veiculadas em revistas femininas não científicas impressas. **Revista Interdisciplinar**, v.8, n.4, p.135-142. Out. 2015.

LÓPEZ-CEPERO, A.A.; PALACIOS, C.. Association of the intestinal microbiota and obesity. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 34, n. 2, 2015

LOUZADA, M.L.C.; MARTINS, A.P.B.; CANELLA, D.S.; BARALDI, L.G.; LEVY,R.B.; CLARO, R.M.; MOUBARAC, J.; CANNON, G.; MONTEIRO, C. A. Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil (2008-2009). **Revista de Saúde Pública**, V. 49, N. 38, 2015.

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

LUTOMSKI, J.E.; VAN DEN BROECK, J.; HARRINGTON, J.; SHIELY, F.; PERRY, I.J. Sociodemographic, lifestyle, mental health and dietary factors associated with direction of misreporting of energy intake. **Public health nutrition**, v. 14 n. 03), p.532-541, aug., 2009.

MAI, V.; MCCRARY, Q.M.; SINHA, R; GLEI, M.. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. **Nutrition journal**, v. 8, n. 1, p.1, 2009.

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.

MANZ W.; AMANN R.; LUDWIG W.; VANCANNEYT M.; SCHLEIFER K.H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga–flavobacter–bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v. 142, p. 1097–1106, mai. 1996.

MANZ W.; AMANN R.; LUDWIG W.; WAGNER M.; SCHLEIFER K.H. Phylogenic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems band solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, p. 593–600, dez. 1992.

MATARESE, G.; PROCACCINI, C.; DE ROSA, V. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis?. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 4, p. 893-899, Nov. 2008.

MEIER, H.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 186–196, mai. 1999.

MOKDAD, A. H.; FORD, E.S.; BOWMAN, B. A.; DIETZ, W. H.; VINICOR, F.; BALES, V. S.; MARKS, J. S. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. **Jama**. v. 289, p.76-79, 2003.

MONTEIRO, C.A.; LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; CASTRO, I.R.R.D.; CANNON, G.. A new classification of foods based on the extent and purpose of their processing. **Cadernos de saúde pública**, v. 26, n. 11, p.2039-2049, 2010

MONTEIRO, C.A.; LOUZADA, M.L.C.; MARTINS, A.P.B.; CANELLA, D.S.; BARALDO, L.G.; LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; MOUBARAC, J.C.; CANNON, G. Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil. **Rev. Saúde pública**, v. 49, n. 39, 2015.

MORALES, P.; BRIGNARDELLO, J.; GOTTELAND, M. La microbiota intestinal: un novo actor en el desarrollo de la obesidad. **Revista Medica de Chile**, v. 138, p. 1020- 1027, ago., 2010.

MOUBARACI, J.C.; MONTEIRO, C.A.. Participação crescente de produtos ultraprocessados na dieta brasileira (1987-2009). **Rev Saude Publica**, v. 47, n.4, p.656-665, 2013

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzimology**, v. 155, p. 335-350, 1987

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, diabetes and gut microbiota : The hygiene hypotheses expanded?. **Diabetes care**. v.33, n. 10, p. 2277-2284, jul., 2010.

NADAL, I.; SANTACRUZ, A.; MARCOS, A.; WARNBERG, J.; GARAGORRI, M.; MORENO, L.A.; MARTIN-MATILLAS, M.; CAMPOY, C.; MARTÍ, A.; MOLERES, A; DELGADO, M.. Shifts in *clostridia*, *bacteroides* and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 7, p.758-767, 2009

NETO, J.M.; MOITA, G.C.. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p.467-469, 1998.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, 2012.

OGDEN, C. L.; CARROLL, M.D.; FLEGAL, K. M. High body mass index for age among US children and adolescents. **Jama**. v. 299, p. 2401-2405, may. 2008.

OLIVEIRA, C. B A. C. de. **Obesidade: um olhar social**. 2013. 54 f. Monografia (Bacharelado em Serviço Social)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

PACHECO, M. **Tabela de equivalentes, medidas caseiras e composição química dos alimentos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2011.

PAVEL, A.B.; VASILE, C.I., 2012. PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. **BMC bioinformatics**, v.13, n.1, p.9, jan. 2012.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P.; STOBBERING, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511-521, out. 2006.

PEREIRA, L.O., FRANCISCHI, R.P.D.; LANCHA JR, A.H.. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, n. 47, v. 2, p.111-127, abr. 2003.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para a Decisão Nutricional**. 4 ed. rev. atual.- Barueri, SP: Manole, 2013.

PISTELLI, G.C.; MAREZE-DA-COSTA, C.E., 2010. Bactérias intestinais e obesidade. **Saúde e Pesquisa**, v.3, n. 1, p. 115-119, abr. 2010.

PI-SUNYER, F. X.; BECKER, D. MM.; BOUCHARD, C.; CARLETON, R. A.; COLDITZ, G. A.; DIETZ, W. H.; FOREYT, J. P.; GARRISON, R. J.; GRUNDY, S. M.; HANSEN, B. C.; HIGGINS, M.; HILL, J. O.; HOWARD, B. V.; KLESGES, R. C.; KUCZMARSKI, R. J.; KUMANYIKA, S.; LEGAKO, R. D.; PREWITT, T. E.; ROCCHINI, A. P.; SMITH, P. L.; SNETSELAAR, L. G.; SOWERS, J. R.; WEINTRAUB, M.; WILLIAMSON, D. F.; WILSON, G. T. Clinical Guidelines On The Identification, Evaluation, And Treatment Of Overweight Na Obesity In Adults. **National Institutes Of Health**. N. 98, 228 p., set. 1998.

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

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. B.; MANICHANH, C.; NIELSE, T. ; WANG, J.. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, abr.2010.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; JONKERS, D.M.; SALONEN, A.; HANEVIK, K.; RAES, J.; JALANKA, J.; DE VOS, W.M.; MANICHANH, C.; GOLIC, N.; ENCK, P.; PHILIPPOU, E.. Intestinal Microbiota And Diet in IBS: Causes, Consequences, or Epiphenomena? **The American journal of gastroenterology**. V.110, p. 278-287, jan. 2015.

RTVELADZE, K.; MARSH, T.; WEBBER, L.; KILPI, F.; LEVY, D.; CONDE, M.; MCPHERSON, K.; BROWN, M. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. **PLoS ONE**. V.8, N.3, July 2013.

REZENDE, F.A.C., ROSADO, L.E.F.P.L., FRANCESCHINNI, S.D.C.C., ROSADO, G.P. AND RIBEIRO, R.D.C.L.. Aplicabilidade do índice de massa corporal na avaliação da gordura corporal. **Rev. bras. med. esporte**, n. 16, v.2, p.90-94, mar./abr. 2010.

RTVELADZE, K.; MARSH, T.; WEBBER, L.; KILPI, F.; LEVY, D.; CONDE, M.; MCPHERSON, K.; BROWN, M. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. **PLoS ONE**. V.8, N.3, July 2013.

SALES, R. L.; COSTA, N. M. B.; SILVA, M. M. S. **Avaliando o consumo alimentar por fotos**. Viçosa: UFV; 2004.

Sauceda, E.N.R. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **Ra Ximhai**, n. 7, v.1, p.153-170, jan. 2011.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts, 2007. **PLoS Med**. V. 4, n. 5, 2007.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHAFERS, K.; BEIJER, S.; BOSS, N. A.; DONUS, C.; HARD, P. D. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190-195, apr. 2010.

SEIDELL, J. C. Obesity, insulin resistance and diabetes-a worldwide epidemic. **British Journal Nutrition**, v.83 Suppl, p.5-8, out. 2000.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-904, may. 2010.

SHEN, J.; OBIN, M. S.; ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 1, p. 39-58, jul. 2013.

SHIN, N.R.; WHON, T.W.; BAE, J.W. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p.496-503, 2015

SIEGMUND, B.; LEAR-KAUL, K. C.; FAGGIONI, R.; FANTUZZI, G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 552-560, feb. 2002.

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

SPEAKMAN, J. R. Obesity: The Integrated Roles of Environment and Genetics. **Journal of Nutrition**, V. 134, p. 2090–2105, 2004. Disponível em: [www.jn.nutrition.org](http://www.jn.nutrition.org). Acesso em: 12 out. 2014.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6. P. 2094-2101, jun., 2011.

SWINBURN, B. A.; SACKS, G.; HALL, K.; D.; McPHERSON, K.; FINEGOOD, D. T.; MOODIE, M. L.; GORTMAKER, S. L. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The Lancet**, v. 378, p. 804-14, aug. 2011.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M.. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 23, p. 160-168, 2013.

THOMAS F.; HEHEMANN J-H.; REBUFFET E.; CZJZEK M.; MICHEL G. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 93, 2011.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.772-783,oct. 2006.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; KASER, A. Obesity and the microbiota. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1476-1483, 2009.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiology Reviews**, v. 93. p. 1–21, Jan. 2013.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO, B. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; SAAD, M. J. A. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 139-144, 2009.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. I. The core gut microbiome, energy balance and obesity. **The Journal of physiology**, v. 587, n. 17, p. 4153-4158, 2009.

TURNBAUGH, P.J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B.L.; DUNCAN, A.; LEY, R.E.; SOGIN, M.L.; JONES, W.J.; ROE, B.A.;AFFOURTIT, J.P.; EGHOLM, M.. A core gut microbiome in obese and lean twins. **nature**, v, 457, n. 7228, p.480-484, jan. 2009b.

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

VENTURINI, C.D.; ENGROFF, P.; GOMES, I.; DE CARLI, G.A.. Prevalência de obesidade associada à ingestão calórica, glicemia e perfil lipídico em uma amostra

populacional de idosos do Sul do Brasil. **Rev. bras. geriatr. gerontol**, v. 16 n.3, p.591-601, 2013.

VILLELA, N. B.; NETO, O. B.; CURVELLO, K. L.; PANEILI, B. E.; SEAL, C.; SANTOS, D.; CRUZ, T. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición Hospitalaria**, v. 19, n. 6, p. 367-371, 2004.

VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E.G.; DE VOS, W.M.; HOEKSTRA, J.B.L.; NIEUWDORP, M.. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. **Diabetologia**. v. 53, n.4, p.606-613, jan. 2010.

WALTER, J.; LEY, R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 65, p. 411–29, jun. 2011

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, dec., 2003.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. 1990.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S., 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112 n.12, p.1785-1788. Dec. 2003.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO consultation on obesity. (WHO Technical Report Series n. 894). Geneva, Switzerland: WHO, 2000.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN. Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, E; BALDASSANO, R.; NESSEL. L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

WU, X.; MA, C.; HAN, L.; NAWAZ, M.; GAO, F.; ZHANG, X.; YU, P.; ZHAO, C.A.; LI, L.; ZHOU, A.; WANG, J.. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. **Current microbiology**, v. 61, n.1, p.69-78, jan. 2010.

XU, X; Xu, P.; MA, C.; TANG, J.; ZHANG, X. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 318-337, dec. 2012

YU, Z.. MORRISON, M.. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient

gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p.4800-4806, apr, 2004.

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

**APÊNDICE A- Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo Eutrófico.**

<b>Paciente</b>	<b>Quantidade de calorias ingeridas</b>	<b>Quantidade de calorias recomendada</b>	<b>Diferença</b>
1	2125,5012	2011,68	-113,82
2	2173,8968	1510,44	-663,45
3	2088,34384	895,02	-1193,32
4	1719,092	1599,62	-119,47
5	2212,94942	1592,79	-620,16
6	1631,866	2648,29	1016,42
7	1829,652	2201,29	371,63
8	2507,445	1419,45	-1087,99
9	1793,946	1246,04	-547,91
10	2132,0544	1249,80	-882,26
11	2590,9692	2317,65	-273,32
12	1803,4596	1784,06	-19,40
13	1831,304	982,08	-849,23
14	1777,482	1720,53	-56,95
15	1732,302	1799,29	66,99
16	2767,13914	1637,60	-1129,54
17	2182,534	2099,58	-82,96
18	2375,72184	2683,64	307,92
19	2544,298	4231,67	1687,38
20	2783,1131	2013,29	-769,83
21	1816,4048	1834,76	18,35
22	1759,818	2392,36	632,54
23	1865,342	1808,41	-56,93
24	2067,33	1729,53	-337,80

**APÊNDICE B- Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo com sobrepeso.**

<b>Paciente</b>	<b>Quantidade de calorias ingeridas</b>	<b>Quantidade de calorias recomendada</b>	<b>Diferença (ingerida-recomendada)</b>
1	2023,51	2670,90	647,39
2	2290,93	3351,91	1060,98
3	2232,46	1788,24	-444,23
4	1775,88	2328,45	552,57
5	2312,68	3277,40	964,72
6	2764,21	2812,69	48,48
7	2212,54	2176,60	-35,94
8	2504,69	1186,13	-1318,56
9	3286,32	2246,00	-1040,32
10	2299,43	991,82	-1307,61
11	1644,81	876,01	-768,79
12	2595,59	4759,70	2164,11
13	2484,52	2892,46	407,94
14	3023,29	1811,45	-1211,84
15	2028,86	1430,07	-598,79
16	2687,77	1449,06	-1238,71
17	1950,765	1998,68	47,92
18	1990,755	1535,51	-455,25
19	2390,8384	1437,91	-952,93
20	1939,26	2030,87	91,61
21	2502,73	1449,08	-1053,65
22	1920,1524	1024,49	-895,66
23	2936,62	2491,95	-444,67
24	2539,5112	2460,28	-79,23

**APÊNDICE C- Tabelas de quantidade de calorias ingeridas, recomendadas e diferença entre as duas dos grupo em estudo Obeso.**

<b>Paciente</b>	<b>Quantidade de calorias ingeridas</b>	<b>Quantidade de calorias recomendada</b>	<b>Diferença (ingerida-recomendada)</b>
1	2152,81	2670,90	518,09
2	3123,91	973,02	-2150,89
3	2136,72	2065,47	-71,25
4	2763,28	4504,78	1741,50
5	2927,56	2377,52	-550,04
6	2205,79	1517,24	-688,55
7	3276,08	2070,31	-1205,77
8	1935,47	1500,33	-435,14
9	2471,93	1952,36	-519,57
10	2741,10	1707,39	-1033,71
11	2511,75	3288,64	776,89
12	1784,26	1394,31	-389,95
13	2723,50	2689,67	-33,83
14	2452,34	2467,46	15,12
15	2085,06	5388,86	3303,80
16	3704,30	2009,64	-1694,66
17	3364,82	3073,26	-291,56
18	2410,93	1339,59	-1071,34
19	2800,20	1890,70	-909,50
20	2415,90	2157,41	-258,49
21	2782,54	1126,28	-1656,26
22	2099,55	1736,53	-363,02
23	2527,02	1569,87	-957,14
24	2548,55	1079,04	-1469,51

**APÊNDICE D- Tabela de resultados de razão Firmicutes/Bacteroidetes por grupo de indivíduos.**

<b>Nº do Indivíduo</b>	<b>Eutróficos</b>	<b>Com sobrepeso</b>	<b>Obesos</b>
1	1,57	0,80	1,13
2	0,89	0,83	1,19
3	0,95	1,38	1,31
4	0,87	0,95	1,23
5	0,91	0,92	1,05
6	0,86	1,05	1,019
7	0,78	0,90	1,18
8	0,78	0,75	0,09
9	0,83	0,74	0,97
10	0,94	0,90	1,15
11	0,85	1,04	0,74
12	0,84	0,87	1,12
13	0,89	0,75	1,22
14	0,73	0,73	0,81
15	1,09	0,93	0,82
16	0,66	0,80	1,71
17	0,98	1,00	0,87
18	0,9	0,95	0,71
19	1,26	0,72	0,94
20	0,93	0,84	0,74
21	0,86	0,81	1,09
22	1,02	0,86	0,92
23	0,90	1,07	0,84
24	0,83	0,98	0,87

**APÊNDICE E- Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo eutrófico.**

	Acitnobacteria	α-proteobactéria	B-proteobactéria	Y-proteobactéria	verrucomicrobia	Firmicutes	Bacteroidetes	Grupo <i>Clostridium hystoliticum</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidaceae</i>
<b>IMC</b>	-0,393	-0,200	-0,244	-0,381	-0,467	0,057	-0,192	-0,249	-0,364	-0,315
<i>P</i>	0,064	0,359	0,261	0,073	0,025	0,795	0,381	0,253	0,087	0,143
<b>CC</b>	0,042	0,013	-0,109	0,021	-0,071	0,201	-0,015	0,051	-0,121	-0,122
<i>P</i>	0,850	0,953	0,619	0,923	0,748	0,359	0,946	0,817	0,581	0,578
<b>CA</b>	-0,055	0,047	-0,124	-0,056	0,039	0,047	-0,143	-0,028	-0,154	-0,135
<i>P</i>	00,805	00,833	0,572	0,801	0,858	0,833	0,516	0,899	0,482	0,539
<b>CQ</b>	-0,404	0,068	-0,074	-0,120	-0,224	-0,205	-0,199	-0,161	0,288	0,087
<i>P</i>	0,056	0,759	0,738	0,584	0,305	0,348	0,362	0,462	0,183	0,694
<b>RCQ</b>	0,309	0,017	-0,078	0,133	0,157	0,259	-0,002	0,228	-0,224	-0,092
<i>P</i>	0,152	0,939	0,725	0,547	0,476	0,233	0,995	0,295	0,305	0,676
<b>Glicose</b>	-0,005	0,034	-0,138	-0,042	-0,106	0,202	-0,070	0,142	-0,261	-0,182
<i>P</i>	0,982	0,877	0,529	0,849	0,629	0,355	0,751	0,518	0,229	0,405
<b>Insulina</b>	-0,340	0,043	-0,255	-0,157	-0,043	-0,052	-0,139	0,228	-0,157	-0,109
	0,112	0,847	0,241	0,475	0,846	0,812	0,527	0,295	0,474	0,620
<b>Homa-ir</b>	-0,360	-0,062	-0,260	-0,243	-0,173	0,068	-0,102	0,134	-0,305	-0,241
<i>P</i>	0,092	0,780	0,231	0,264	0,429	0,756	0,644	0,542	0,158	0,268
<b>TG</b>	-0,195	0,017	-0,133	0,071	0,028	0,049	-0,061	0,137	0,071	-0,067
<i>P</i>	0,372	0,938	0,545	0,749	0,899	0,825	0,783	0,532	0,748	0,760
<b>Colesterol</b>	-0,589	-0,514	-0,559	-0,462	-0,199	-0,220	-0,248	-0,022	-0,312	-0,205
<i>P</i>	0,003*	0,012*	0,006*	0,026*	0,362	0,313	0,255	0,920	0,147	0,348
<b>LDL</b>	-0,455	-0,588	-0,695	-0,457	-0,184	-0,474	-0,477	-0,073	-0,324	-0,298
<i>P</i>	0,029*	0,003*	<0,001*	0,028*	0,400	0,022*	0,021*	0,742	0,132	0,168
<b>HDL</b>	-0,372	-0,172	-0,053	-0,259	-0,166	0,028	0,152	0,103	-0,034	0,156
<i>P</i>	0,080	0,432	0,808	0,232	0,448	0,898	0,489	0,641	0,876	0,478
<b>Cortisol</b>	0,091	0,389	0,446	0,260	-0,014	0,107	0,290	-0,146	0,053	0,086
<i>P</i>	0,678	0,067	0,033*	0,232	0,948	0,626	0,179	0,505	0,810	0,697

IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CA= circunferência do quadril; RCQ= relação cintura quadril; TG= triglicérides; LDL= colesterol-LDL; HDL= colesterol-HDL. \* valores de *P* significativos.

**APÊNDICE F- Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo com sobrepeso.**

	Acitnobactéria	α-proteobactéria	B-proteobactéria	Y-proteobactéria	verrucomicrobia	Firmicutes	Bacteroidetes	Grupo <i>Clostridium hystolicum</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidaceae</i>
<b>IMC</b>	-0,098	-0,043	-0,352	0,025	-0,341	0,037	-0,020	-0,361	0,059	-0,230
<i>P</i>	0,642	0,838	0,084	0,907	0,095	0,859	0,923	0,076	0,779	0,269
<b>CC</b>	0,128	0,153	-0,086	0,082	-0,059	0,206	0,169	0,144	0,048	-0,213
<i>P</i>	0,542	0,466	0,682	0,698	0,779	0,322	0,965	0,491	0,821	0,306
<b>CA</b>	0,031	-0,176	-0,267	-0,167	-0,195	0,058	-0,033	-0,169	-0,165	-0,287
<i>P</i>	0,882	0,401	0,197	0,424	0,350	0,785	0,876	0,418	0,431	0,165
<b>CQ</b>	0,055	-0,192	-0,329	-0,030	-0,368	0,264	0,215	-0,060	-0,084	-0,188
<i>P</i>	0,795	0,357	0,108	0,887	0,070	0,202	0,302	0,777	0,691	0,368
<b>RCQ</b>	0,061	0,244	0,049	0,068	0,079	0,012	-0,131	0,106	0,068	-0,117
<i>P</i>	0,772	0,241	0,814	0,747	0,709	0,954	0,533	0,613	0,748	0,579
<b>Glicose</b>	0,072	0,029	-0,138	0,087	-0,096	0,058	-0,111	-0,027	0,016	-0,117
<i>P</i>	0,733	0,891	0,510	0,678	0,649	0,781	0,598	0,899	0,939	0,577
<b>Insulina</b>	-0,369	-0,310	-0,171	-0,111	-0,328	-0,129	-0,209	-0,117	-0,081	-0,199
<i>P</i>	0,070	0,131	0,415	0,598	0,110	0,540	0,316	0,578	0,701	0,341
<b>Homa-ir</b>	-0,294	-0,305	-0,209	-0,061	-0,340	-0,082	-0,191	-0,153	-0,081	-0,155
<i>P</i>	0,163	0,147	0,326	0,775	0,104	0,702	0,372	0,475	0,707	0,469
<b>TG</b>	0,127	0,177	0,261	0,213	0,104	0,140	0,129	0,166	0,078	0,193
<i>P</i>	0,547	0,398	0,208	0,308	0,621	0,505	0,539	0,428	0,709	0,356
<b>Colesterol</b>	0,040	0,102	0,063	0,121	0,043	0,005	-0,050	0,123	0,092	0,033
<i>P</i>	0,848	0,626	0,766	0,565	0,839	0,983	0,812	0,559	0,662	0,876
<b>LDL</b>	-0,012	0,044	0,007	0,059	0,015	-0,041	-0,083	0,060	0,014	-0,076
<i>P</i>	0,953	0,835	0,975	0,781	0,944	0,846	0,694	0,775	0,948	0,720
<b>HDL</b>	0,191	-0,144	0,010	0,024	0,082	0,089	0,058	0,000	0,112	0,329
<i>P</i>	0,359	0,491	0,962	0,911	0,697	0,672	0,783	10,000	0,596	0,108
<b>Cortisol</b>	-0,095	0,036	0,290	-0,054	0,260	0,097	0,135	0,197	-0,003	0,167
<i>P</i>	0,660	0,867	0,170	0,802	0,219	0,652	0,530	0,355	0,987	0,436

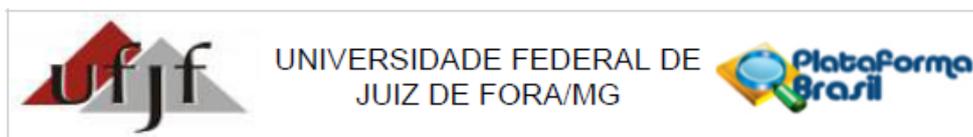
IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CA= circunferência do quadril; RCQ= relação cintura quadril; TG= triglicérides; LDL= colesterol-LDL; HDL= colesterol-HDL. \* valores de *P* significativos.

**APÊNDICE G- Análise de correlação de spearman entre os grupos bacterianos e parâmetros relacionados aos indivíduos do grupo Obeso.**

	Acitnobactéria	α-proteobactéria	B-proteobactéria	Y-proteobactéria	verrucomicrobia	Firmicutes	Bacteroidetes	Grupo <i>Clostridium hystoliticum</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidaceae</i>
<b>IMC</b>	0,018	0,261	0,349	0,356	0,341	0,392	0,392	-0,011	0,468	0,216
<i>P</i>	0,934	0,218	0,095	0,088	0,103	0,058	0,058	0,960	0,021*	0,310
<b>CC</b>	0,111	0,106	0,249	0,260	0,040	0,275	0,322	-0,034	0,375	0,016
<i>P</i>	0,606	0,624	0,241	0,220	0,853	0,194	0,124	0,874	0,071	0,941
<b>CA</b>	0,011	0,080	0,250	0,252	0,164	0,241	0,323	-0,015	0,424	0,055
<i>P</i>	0,960	0,712	0,238	0,235	0,444	0,256	0,124	0,946	0,039*	0,798
<b>CQ</b>	-0,066	0,072	0,099	0,159	0,134	0,310	0,186	-0,055	0,303	-0,005
<i>P</i>	0,759	0,738	0,645	0,459	0,532	0,141	0,384	0,798	0,150	0,981
<b>RCQ</b>	0,158	0,013	0,167	0,203	-0,070	-0,022	0,202	-0,113	0,152	-0,002
<i>P</i>	0,461	0,952	0,436	0,340	0,745	0,917	0,345	0,599	0,478	0,994
<b>Glicose</b>	-0,043	-0,191	0,084	-0,222	-0,087	-0,016	-0,040	-0,197	-0,130	-0,003
<i>P</i>	0,842	0,371	0,698	0,297	0,687	0,940	0,851	0,357	0,544	0,990
<b>Insulina</b>	-0,024	0,050	0,109	0,178	0,058	0,021	0,319	0,125	0,223	0,176
	0,913	0,819	0,620	0,418	0,793	0,925	0,138	0,571	0,306	0,421
<b>Homa-ir</b>	-0,032	-0,003	0,133	0,120	0,060	0,010	0,326	0,091	0,235	0,238
<i>P</i>	0,888	0,991	0,556	0,595	0,790	0,966	0,138	0,688	0,292	0,286
<b>TG</b>	-0,044	-0,049	0,218	-0,085	0,141	-0,107	-0,047	-0,033	-0,059	0,107
<i>P</i>	0,837	0,819	0,305	0,692	0,510	0,617	0,829	0,878	0,785	0,619
<b>Colesterol</b>	0,052	-0,022	0,109	0,053	0,250	0,129	-0,013	0,068	-0,064	0,051
<i>P</i>	0,809	0,919	0,613	0,806	0,238	0,547	0,951	0,752	0,767	0,812
<b>LDL</b>	0,193	0,034	0,197	0,295	0,400	0,182	0,141	0,204	0,146	0,264
<i>P</i>	0,378	0,879	0,369	0,172	0,059	0,405	0,522	0,351	0,506	0,224
<b>HDL</b>	-0,022	-0,089	-0,074	-0,209	-0,162	0,063	-0,310	-0,164	-0,273	-0,262
<i>P</i>	0,919	0,678	0,730	0,326	0,449	0,769	0,140	0,445	0,196	0,216
<b>Cortisol</b>	-0,085	-0,563	-0,305	-0,406	-0,334	-0,316	-0,437	-0,136	-0,403	-0,324
<i>P</i>	0,694	0,004*	0,148	0,049*	0,110	0,132	0,033*	0,527	0,051	0,123

IMC= índice de massa corporal; CC= circunferência da cintura; CA= circunferência do quadril; RCQ= relação cintura quadril; TG= triglicérides; LDL= colesterol-LDL; HDL= colesterol-HDL. \* valores de *P* significativo

## ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF



### PARECER CONSUBSTANCIADO 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:** Cláudio 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:**

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.propesq@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: 36.036-900  
UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

## ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF  
36036-900 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 e 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 à 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)**

## ANEXO C – 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

## ANEXO D – Questionário quantitativo de frequência alimentar.

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

Bolo convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>DSM</b>			
<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			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>DSM</b>			
<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			

<b>Cereais</b>	<b>Quantas vezes você come</b>	<b>Unidade</b>	<b>Pequena</b>	<b>Média</b>	<b>Grande</b>
Empada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
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	D S M			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
<b>Frutas</b>					
Laranja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maçã	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Melancia/ melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Uva	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Outras frutas_____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de outras frutas_____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
<b>Leguminosas</b>					
Feijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

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			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>DSM</b>			
<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			
	<b>N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</b>	<b>DSM</b>			

## ANEXO E – Ficha para dados antropométricos.

Data	
Peso atual	
Altura	
IMC/Classificação	
CC	
CA	
CQ	
Relação C/Q	
IC	

## ANEXO F- Classificação de alimentos com base no processamento industrial.

Grupos	Definição e características	Exemplos
Alimentos in natura ou minimamente processados e preparações culinárias à base desses alimentos	Alimentos in natura são aqueles obtidos diretamente de plantas ou de animais (como folhas e frutos ou ovos e leite) e adquiridos para consumo sem que tenham sofrido qualquer alteração após deixarem a natureza. Alimentos minimamente processados são alimentos in natura que, antes de sua aquisição, foram submetidos a alterações mínimas que não adicionam substâncias ao alimento. Limpeza, remoção de partes não comestíveis, fracionamento, secagem, embalagem, fermentação, pasteurização, resfriamento, congelamento, moagem e refinamento são exemplos de processos que transformam os alimentos in natura. As preparações culinárias baseadas nesses alimentos incluem o alimento in natura ou minimamente processado usado como item principal da receita e todos os demais ingredientes, incluindo ingredientes culinários como óleos, gorduras, açúcar e sal, outros alimentos <i>in natura</i> ou minimamente processados (como alho e cebola) e mesmo alimentos processados ou ultraprocessados (como queijos e embutidos) quando são incluídos como itens secundários as preparações culinárias. Essas preparações são feitas em cozinhas domésticas ou de restaurantes tradicionais ou em locais assemelhados.	Legumes, verduras, frutas, batata, mandioca e outras raízes e tubérculos <i>in natura</i> ou embalados, fracionados, refrigerados ou congelados, arroz branco, integral ou parboilizado, a granel ou embalado, milho em grão ou na espiga, grãos de trigo e de outros cereais, feijão de todas as cores, lentilhas, grão de bico e outras leguminosas, cogumelos frescos ou secos, frutas secas, sucos de frutas e sucos de frutas pasteurizados e sem adição de açúcar ou de outras substâncias, castanhas, nozes, amendoim e outras oleaginosas sem sal ou açúcar, cravo, canela, especiarias em geral e ervas frescas ou secas, farinhas de mandioca, de milho ou de trigo e macarrão ou massas frescas ou secas feitas com essas farinhas e água, carnes de gado, de porco e de aves e pescados frescos, resfriados ou congelados, leite pasteurizado, ultrapasteurizado (longa vida) ou em pó, iogurte (sem adição de açúcar, adoçantes ou corantes), ovos, chá, café e água potável.
Alimentos processados	Alimentos processados são fabricados pela indústria com a adição de sal ou açúcar ou outra substância de comum uso culinário a alimentos <i>in natura</i> ou minimamente processados para torná-los duráveis e mais agradáveis ao paladar. São produtos derivados diretamente de alimentos e são reconhecidos como versões dos alimentos originais. As técnicas de processamento desses produtos se assemelham a técnicas culinárias, podendo incluir cozimento, secagem, fermentação, acondicionamento dos alimentos em latas ou vidros e uso de métodos de preservação como salga, salmoura, cura e defumação.	Conservas de hortaliças, milho ou ervilhas, frutas em calda ou cristalizadas, carnes salgadas, peixes enlatados e preservados em óleo, queijos feitos de leite e sal e pães feitos de farinha de trigo, água, leveduras e sal (sem adição de outras substâncias como gordura hidrogenada e aditivos).
Alimentos ultraprocessados	Alimentos ultraprocessados são formulações industriais feitas inteiramente ou majoritariamente de substâncias extraídas de alimentos (óleos, gorduras, açúcar, amido, proteínas), derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, amido modificado) ou sintetizadas em laboratório com base em matérias orgânicas como petróleo e carvão (corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e outros aditivos usados para dotar os produtos de propriedades sensoriais atraentes). Técnicas de manufatura incluem extrusão, moldagem e pré-processamento por fritura ou cozimento.	Pães de forma, pães para hambúrguer ou <i>hot dog</i> , pães doces e produtos panificados cujos ingredientes incluem substâncias como gordura vegetal hidrogenada, açúcar, amido, soro de leite, emulsificantes e outros aditivos, bolachas doces e salgadas, salgadinhos tipo <i>chips</i> , doces industrializados e guloseimas em geral (balas, sorvetes, chocolates), refrigerantes, sucos artificiais, bebidas lácteas adoçadas e aromatizadas, bebidas energéticas, molhos industrializados, margarina, embutidos, pratos industrializados prontos para aquecer, hambúrgueres, <i>hot dog</i> , <i>nuggets</i> de frango ou de peixe, barras de cereal