

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

**Thaís Oliveira de Paula**

**Comunidade bacteriana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos:  
estudo da microbiota fecal por abordagem metataxonômica.**

**Juiz de Fora**

**2020**

**THAÍS OLIVEIRA DE PAULA**

**Comunidade bacteriana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos:**  
estudo da microbiota fecal por abordagem metataxonômica.

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Imunologia/DIP.

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

**Co-orientador: Prof. Dra. Vânia Lúcia da Silva**

**Juiz de Fora**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

De Paula, Thaís Oliveira.

Comunidade bacteriana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos : estudo da microbiota fecal por abordagem metataxômica. / Thaís Oliveira De Paula. -- 2020.

99 p.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientador: Vânia Lúcia da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2020.

1. Obesidade. 2. Microbiota intestinal. 3. Biblioteca metagenômica 16S rRNA. I. Diniz, Cláudio Galuppo, orient. II. Silva, Vânia Lúcia da, coorient. III. Título.

**Thaís Oliveira De Paula**

**Comunidade bacteriana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos: estudo da microbiota fecal por abordagem metataxonômica**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 01/12/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**  
Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof.ª Dr.ª Vânia Lúcia da Silva**  
Co-orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof.ª Dr.ª Vanessa Cordeiro Dias**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof.ª Dr.ª Alessandra Barbosa Ferreira Machado**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof.ª Dr.ª Aline Dias Paiva**  
Universidade Federal Do Triângulo Mineiro

---

**Prof.ª Dr.ª Juliana Alves Resende**  
Universidade Federal do Espírito Santo

OBS: Todas as participantes deram anuência para que o Presidente da banca assinasse a Folha de Aprovação por todos, conforme resolução nº 01/2020 CSPP/UFJF.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida maravilhosa e por essa oportunidade de crescimento pessoal.

A todos os voluntários, pela participação nessa pesquisa, sem eles esse trabalho não seria possível.

Ao professor Cláudio Galuppo Diniz pela orientação, ensinamentos e oportunidades de aprendizado e crescimento durante a realização deste trabalho.

À prof. Vânia lúcia da Silva pela co-orientação e confiança.

À Juliane pela infinita paciência e pelos ensinamentos.

À Analice e Alessandra pela colaboração, apoio e incentivo.

A todos os professores do programa de pós graduação em Ciências Biológicas com os quais eu tive a oportunidade de aprender durante a vida acadêmica, por terem colaborado na minha formação e crescimento.

Às minhas parceiras de projeto, Francis e Marjorie. Contar com o apoio de vocês foi fundamental para triar esse caminho.

À Thelma e Igor, pelo incentivo. Os melhores parceiros de trabalho.

À todos os professores de departamento de microbiologia do ICB-UFJF pelo apoio.

Aos alunos de iniciação científica e pós- graduação do laboratório – companheirismo e ajuda inestimáveis.

Aos meus amigos e familiares que de perto e de longe contribuíram muito.

À CAPES, FAPEMIG e ao PNCQ pelo auxílio financeiro, o qual foi fundamental para que esse trabalho fosse desenvolvido.

## RESUMO

A obesidade, nos dias atuais, é considerada uma pandemia, acometendo pessoas de todas as idades, sexo e etnia. É uma doença que cursa com um estado inflamatório crônico de baixo grau. Sua causa é multifatorial e está associada a complicações metabólicas de alta morbimortalidade que geram elevados custos ao sistema de saúde. A microbiota intestinal humana (MIH) possui grande importância no desenvolvimento não só da função intestinal, mas de outros sistemas corporais. Estudos recentes têm associados à MIH ao desenvolvimento e manutenção da obesidade envolvendo vários mecanismos distintos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a comunidade bacteriana intestinal, comparativamente entre indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, a partir de banco de DNA metagenômico fecal, por técnica de sequenciamento de nova geração, e correlacionar, através da análise de correlação linear de Pearson, o perfil microbiano, os dados nutricionais, laboratoriais e antropométricos previamente analisados. Foram avaliados 72 indivíduos classificados em eutróficos (n=22), com sobrepeso (n=23) e obesos (n=21), de acordo com o IMC. A análise de rarefação e o índice chao-1 mostrou que indivíduos obesos possuem menor riqueza de espécies comparado aos outros dois grupos estudados, porém não foi evidenciado diferença na composição taxonômica entre os grupos. Diferente da maioria dos estudos, não encontramos diferença estatística na abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, nem na relação Firmicutes/Bacteroidetes. Apenas no filo Verrucomicrobia foi evidenciado uma diferença estatística significativa entre eutróficos e obesos, sendo a abundância desse filo no grupo com sobrepeso estatisticamente igual aos dois grupos. Em relação aos gêneros os grupos de eutróficos e obesos se diferenciaram em relação aos gêneros *Prevotella* ( $P = 0,0228$ ), *Prevotella 1* ( $P = 0,0291$ ), *Prevotella 9* ( $P = 0,0178$ ), *Alistipes* ( $P = 0,0030$ ) e *Rumicococaceae;Other* ( $P = <0,0001$ ) e *Akkermansia* ( $p = 0,0188$ ), sendo o grupo com sobrepeso semelhante aos dois grupos. Entre Sobrepesos e obesos foi encontrado diferença estatística entre *Alistipes* ( $P = 0,0030$ ), *Rumicococaceae;Others* ( $P = <0,0001$ ) e *Fecalibacterium* ( $P = 0,0296$ ). Entre os grupos eutrófico e com sobrepeso não foi encontrada nenhuma diferença. A microbiota core do grupo eutrófico apresentou um número consideravelmente maior de OTU's - 188 no total em relação ao grupo com sobrepeso que apresentou 83 OTU's e ao grupo de obesos, que por sua vez apresentou apenas 53 OTU's comuns ao grupo, evidenciando novamente, maior riqueza nos dois primeiros grupos em relação aos obesos. A análise de correlação mostrou correlação negativa forte ou muito forte entre Firmicutes e Bacteroidetes nos três grupos estudados, sugerindo que o aumento na

abundância de um deles torna o ambiente intestinal desfavorável para o outro. Em relação às correlações especificamente entre os metadados e os principais filos bacterianos, não houve nenhuma correlação estatística significativa. Concluímos que a microbiota intestinal do grupo obeso possui menor riqueza comparada aos outros dois grupos, além de uma estrutura bacteriana claramente distinta em relação a grupos taxonômicos específicos e uma microbiota *core* menos diversa. Indivíduos com sobrepeso comportam-se de maneira altamente heterogênea apresentando uma estrutura de microbiota intestinal intermediária.

**Palavras Chaves:** Obesidade; Microbiota intestinal; biblioteca genômica 16S rRNA

## ABSTRACT

Obesity today is considered a pandemic affecting people of all ages, sex and race. It is a disease that curves with a chronic inflammatory state of low degree. Its cause is multifactorial and is associated with metabolic complications of high morbidity and mortality that generate high costs to the health system. The human intestinal microbiota (HIM) has great importance in the development of intestinal function. Recent studies have associated HIM with the development and maintenance of obesity involving several distinct mechanisms. The objective of the present study was to evaluate the intestinal bacterial diversity comparatively between eutrophic, overweight and obese individuals, from a database of fecal metagenomic DNA, using a new generation sequencing technique; to correlate the microbial profile with the nutritional, laboratory and anthropometric data previously analyzed. We evaluated 72 individuals classified as eutrophic (n=22), overweight (n=23) and obese (n=21) according to BMI. The rarefaction analysis and the chao-1 index showed that obese individuals have lower species richness compared to the other two groups studied, but no difference in taxonomic composition between the groups was evidenced. Unlike most studies, no statistical difference was found in the abundance of the phyla *Firmicutes* and Bacteroidetes, nor in the *Firmicutes*/ Bacteroidetes ratio. A statistically significant difference was found in the phylum Verrucomicrobia between eutrophic and obese. Regarding bacterial genera, the groups of eutrophic and obese individuals differed in relation to the *Prevotella* ( $p = 0.0228$ ), *Prevotella 1* ( $p = 0.0291$ ), *Prevotella 9* ( $p = 0.0178$ ), *Alistipes* ( $p = 0.0030$ ), *Rumicococaceae*; *Other* ( $p = <0.0001$ ) and *Akkermansia* ( $p = 0.0188$ ), the overweight group being similar to the two groups. Between overweight and obese, a statistical difference was found between *Alistipes* ( $p = 0.0030$ ), *Rumicococaceae*; *Others* ( $p = <0.0001$ ) and *Fecalibacterium* ( $p = 0.0296$ ). No difference was found between eutrophic and overweight groups. The core microbiota of the eutrophic group showed a considerably higher number of OTU's - 188 in total in relation to the overweight group that presented 83 OTU's and the obese group, which in turn presented only 53 OTU's common to the group, again showing greater wealth in the first two groups in relation to the obese. The correlation analysis showed a strong or very strong negative correlation between Firmicutes and Bacteroidetes in the three groups studied, suggesting that the increase in the abundance of one of them makes the intestinal environment unfavorable for the other. Regarding the correlations specifically between metadata and the main bacterial phyla, there was no statistically significant correlation. We concluded that the intestinal microbiota of the obese group has less richness compared to the



other two groups, in addition to presenting distinct bacterial structure in relation to specific taxonomic groups and a less diverse core microbiota. Overweight individuals behave in a highly heterogeneous manner with an intermediate intestinal microbiota structure.

**Keywords:** Obesity; Intestinal microbiota; genome library 16S rRN

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Modelo esquemático do sequenciamento na plataforma Illumina. ....	28
Fluxograma 1	- Estratégia experimental.....	31
Figura 2	- Análise em equipamento Bioanalyzer 2010.....	36
Figura 3	- Curva de rarefação dos grupos estudados. ....	39
Figura 4	- Análises de Coordenadas Principais (PCoA). . ....	40
Figura 5	- Taxa de abundância relativa dos principais filos encontrados.....	41
Figura 6	- Box-plot da abundância relativa dos principais filos encontrados .....	42
Figura 7	- Taxa de abundância relativa dos principais gêneros encontrados .....	44
Figura 8	- Box-plot da abundância relativa dos principais gêneros encontrados .....	45
Figura 9	- Representação do Diagrama de Venn do core bacteriano .....	49
Figura 10	- Gráfico de correlação entre metadados e principais filos .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reação de PCR utilizada na amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. .....	333
Tabela 2 - Reação de PCR utilizada para ligação de index .....	333
Tabela 3 - índices de alfa-diversidade. ....	388
Tabela 4 - Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) pertencentes à microbiota core das 66 amostras de fezes analisadas.....	467
Tabela 5 - Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) pertencentes à microbiota core das amostras de fezes do grupo obeso. ....	499
Tabela 6 - Dados nutricionais dos indivíduos estudados.....	77
Tabela 7 - Dados antropométricos dos indivíduos estudados.....	80
Tabela 8 - Dados laboratoriais dos indivíduos estudados. ....	82
Tabela 9 - Número de <i>reads</i> por amostra. ....	85

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMP-Q	Adenosina monofosfato proteína quinase ativada
ATP	Adenosina trifosfato
CRT1	“ <i>Copper transporter-1</i> ” Transportador de cobre-1
DGGE	“ <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ” Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
FFAR	“ <i>Free Fatty Acids Receptors</i> ” Receptores De Ácidos Graxos Livres
FIAF	“ <i>Fasting Induced Adipose Factor</i> ” Fator- Rápido de Adiposidade Induzida
FISH	“ <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> ” Hibridização <i>in Situ</i> Fluorescente
GLP-1	“ <i>Glucagon-Like Peptide-1</i> ” Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1
Gpr41	Receptor Acoplado à Proteína G 41
Gpr43	Receptor Acoplado à Proteína G 43
ICAM-1	“ <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> ” Molécula de Adesão Intercelular-1
IL-1	Interleucina -1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LPL	Lipoproteína Lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	“ <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> ” Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MIH	Microbiota Intestinal Humana
NF $\kappa$ B	“ <i>Nuclear Factor Kappa B</i> ” Fator Nuclear <i>Kappa B</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTU	“ <i>Operational Taxonomic Units</i> ” Unidade Taxonômica Operacional
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” Reação Em Cadeia da Polimerase
PYY	Peptídeo YY
SGLT-1	“ <i>Sodium-Glucose Linked Transporter</i> ” Proteína de Transporte Sódio-Glicose.
SNC	Sistema Nervoso Central
TAB	Tecido Adiposo Branco
TGI	Trato Gastrointestinal
TLR4	“ <i>Toll-Like Receptor 4</i> ” Receptor do Tipo Toll 4

TNF- $\alpha$     “*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ” Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$

VCAM-1    “*Vascular Cell Adhesion Protein 1*” Moléculas de Adesão Celular Vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 OBESIDADE .....	17
2.2 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO .....	18
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL .....	19
2.4 MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE .....	22
<b>2.4.1 Fasting Induced Adipose Factor – FIAF</b> .....	22
<b>2.4.2 Monofosfato de Adenosina Ativado</b> .....	23
<b>2.4.3. Eixo Cérebro-Intestino</b> .....	223
<b>2.4.4 Lipopolissacarídeos de membrana de bactérias Gram negativas</b> .....	24
2.5 MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO PARA ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS.....	25
<b>2.5.1 Metagenômica e metataxômica</b> .....	26
<b>2.5.2 Sequenciamento de nova geração</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	289
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
4.2 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA .....	31
4.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA POR MISEQ ILLUMINA.....	33
4.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA .....	34
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35
<b>5 RESULTADOS</b> .....	36

5.1	CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS METAGÊNOMICAS.....	36
5.2	METADADOS.....	37
5.3	RESULTADO DO SEQUÊNCIAMENTO.....	37
5.3.1	Alfa-diversidade.....	37
5.3.2	Beta-diversidade.....	39
5.3.4	Perfil taxonômico.....	40
5.3.4.1	<i>Abundância relativa dos filos</i> .....	40
5.3.4.2	<i>Abundância relativa dos gêneros e outros grupos</i> .....	42
5.3.5	Análise do core bacteriano intestinal.....	45
5.3.6	Análise de correlação.....	49
6	DISCUSSÃO.....	53
6.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	62
7	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE A - Dados nutricionais dos indivíduos estudados.....	77
	APÊNDICE B - Dados antropométricos dos indivíduos estudados.....	80
	APÊNDICE C - Dados laboratoriais dos indivíduo estudados.....	82
	APÊNDICE D - Número de <i>Reads</i> por amostra.....	85
	APÊNDICE E – Artigos publicados.....	857
	APÊNDICE F – Artigo em fase de revisão para submissão.....	859
	ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF.....	90
	ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	92
	ANEXO C- Questionário quantitativo de frequência alimentar.....	94

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública altamente relevante devido a sua prevalência, distribuição mundial e associação com outras doenças, como diabetes e síndrome metabólica, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemias, aterosclerose e algumas outras formas de câncer. A doença é definida, ainda, como de incidência crescente, sendo determinada pela associação de vários fatores: orgânicos, genéticos, ambientais, culturais, alimentares e emocionais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura, que atinge diferentes níveis de severidade, podendo afetar a saúde do indivíduo de várias maneiras. Seu diagnóstico é feito através da determinação do índice de massa corporal (IMC), sendo os indivíduos eutróficos caracterizados por um valor de IMC de 18,5 a 24,9, os com sobrepeso, IMC de 25 a 29,9 e os obesos a partir de 30.

O Ministério da Saúde divulgou uma pesquisa apontando que a obesidade cresceu 60% em dez anos (de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016), e mais da metade (53,8%) da população brasileira apresenta obesidade ou sobrepeso. O levantamento é da Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) e os dados foram coletados em 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal no ano de 2016 na população acima de 18 anos de idade.

Estudos científicos abordando o microbioma humano foram introduzidos como um novo conceito microbiológico nos últimos anos, e é caracterizado pela avaliação de vários aspectos da comunidade microbiana (genes, padrões de expressão, bem como seu papel ecológico) que habita o corpo humano (bactérias, fungos, arqueias e vírus). Estima-se que o microbioma humano albergue cerca de 150 vezes mais genes do que o próprio genoma humano.

Como componente do microbioma humano, a microbiota intestinal é constituída por uma grande quantidade de microrganismos distribuídos de maneira não homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal, sendo o colón a parte que contém o maior número de microrganismos devido, principalmente, à grande quantidade de nutrientes ali disponíveis, ausência de secreções intestinais e ao peristaltismo lento característico do local. A enorme quantidade e diversidade de microrganismos presentes no trato intestinal contribuem com diversas funções, como: função imunomoduladora, contribuindo para a maturação local e sistêmica da resposta imune e geração de uma imunotolerância; metabolismo de drogas; favorecimento do desenvolvimento de microvilosidades e importantes funções metabólicas.

Estudos recentes demonstraram o envolvimento da microbiota intestinal na regulação energética, assim como no processo inflamatório, sendo, portanto, a microbiota, um fator



intermediário entre os fatores ambiental e comportamental relacionados à fisiopatologia da obesidade. Estes estudos, utilizando modelos humanos e animais têm sugerido que a composição da microbiota intestinal é diferenciada em indivíduos obesos e eutróficos. Entretanto, trabalhos avaliando a microbiota de indivíduos com sobrepeso ainda são pouco abordados. É importante ressaltar, também, que esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos, que pode refletir diferenças na comunidade microbiana. Dessa maneira, para estudos de microbiota, é essencial a utilização de metadados que abrangem variáveis que incluam observações intrínsecas do indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC, como dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismos), e outros fatores endógenos dos hospedeiros.

A participação das bactérias na composição da microbiota humana é bem estabelecida, sendo conhecidas as principais espécies bacterianas em alguns sítios anatômicos, como pele, cavidade oral, trato geniturinário e trato gastrointestinal. Vários fatores como idade, estilo de vida e alimentação influenciam a composição da microbiota intestinal. Estudos sugerem que a microbiota pode influenciar a homeostase energética do hospedeiro por vários mecanismos, porém, estudos adicionais, de caráter regional ainda são necessários para uma compreensão mais detalhada da relação entre a composição da microbiota intestinal e os variados fenótipos metabólicos (eutróficos, obesos e com sobrepeso), e de como uma modulação destes microrganismos poderia ser benéfica para alteração destes fenótipos.

Em estudos prévios do nosso grupo, investigou-se a diversidade bacteriana intestinal e parâmetros nutricionais de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos da cidade de Juiz de Fora por técnicas moleculares (hibridização fluorescente *in situ* - FISH e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante-DGGE). Os resultados mostraram que a razão Firmicutes/Bacteroidetes encontra-se aumentada nos obesos em relação aos eutróficos, sugerindo um aumento relativo da proporção de Firmicutes nesses indivíduos. De acordo com a literatura, a alteração da distribuição bacteriana e na relação Firmicutes/Bacteroidetes poderia contribuir para uma maior biodisponibilidade de geração de ácidos graxos de cadeia curta no ecossistema intestinal, que por sua vez resultaria em um superávit energético para o hospedeiro, a partir da absorção intestinal dos produtos de metabolismo destas moléculas, além dos efeitos colaterais prejudiciais da sua ocorrência em quantidades aumentadas (aumento da lipogênese). Os resultados da FISH mostraram, também, que a microbiota dos indivíduos com sobrepeso está em um processo de transição, indo ao encontro da microbiota de pessoas obesas. De acordo com os dados de DGGE, houve a formação de um agrupamento de indivíduos obesos e com

sobrepeso, sugerindo uma sobreposição no perfil de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) predominantes entre esses indivíduos.

Os resultados encontrados sugeriram que a microbiota de indivíduos obesos poderia ser característica, de acordo com a tendência observada na literatura, considerando outras populações com diferentes hábitos nutricionais e de comportamento. Porém, as técnicas utilizadas apresentam limitações consideráveis. A metodologia de FISH tem como limitante a cobertura das sondas utilizadas, enquanto o PCR-DGGE não permite a identificação de quais grupos taxonômicos compõem a microbiota intestinal. Dado às limitações dessas técnicas independentes de cultivo e à complexidade do ecossistema intestinal, a metagenômica se tornou uma importante ferramenta para o estudo da microbiota intestinal. A metagenômica consiste no sequenciamento de todos os organismos de um determinado ambiente. Essa metodologia foi impulsionada com o surgimento das plataformas de sequenciamento de nova geração e a consequente redução dos custos de sequenciamento.

Do exposto, dando sequência à linha de pesquisa microbiota e obesidade cujas metas são investigar aspectos da estrutura da microbiota intestinal humana e sua relação com a obesidade, é proposto esse projeto cujo aprofundamento se dá pela abordagem metataxonômica da microbiota intestinal representativa a partir de espécimes fecais de indivíduos eutróficos, com sobre peso e obesos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pelo acúmulo anormal de tecido adiposo como consequência de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia. O excesso de energia ingerido é armazenado no tecido adiposo com consequente aumento da adiposidade (BREHM; D'ALESSIO, 2014). Atinge todas as faixas etárias, gêneros e etnias, sendo considerada, nos dias atuais, uma pandemia. Clinicamente a obesidade é definida pelo índice de massa corporal (IMC), calculado pela divisão do peso em quilogramas pela altura em metros quadrados, e cujos valores são baseados em estudos de morbidade e mortalidade em indivíduos caucasianos (LAGHI, 2018).

De acordo com o IMC, os indivíduos são classificados em: (i) abaixo do peso,  $IMC < 18,5$ ; (ii) eutrófico,  $IMC$  entre 18,5 e 24,9; (iii) sobrepeso,  $IMC$  entre 25 e 29,9; (iv) obesidade grau I,  $IMC$  entre 30 e 34,9; (v) obesidade grau II,  $IMC$  entre 35,0 e 39,9; (vi) obesidade grau III,  $IMC > 40$  (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000)

O IMC é o método diagnóstico preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pelo baixo custo e por ser pouco invasivo, porém não difere a composição entre tecido adiposo visceral e periférico (LAGHI, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2000). Dessa forma a combinação com dados antropométricos, como a medida de circunferência da cintura, uma abordagem prática para analisar a presença de gordura visceral, faz-se necessário (KLEIN *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2002). A gordura abdominal é clinicamente definida com valores de circunferência da cintura igual ou superior a 102 cm nos homens e 88 cm ou mais nas mulheres (LAGHI, 2018).

As causas da obesidade são multifatoriais, estando envolvidos fatores ambientais, genéticos, hormonais e comportamentais que se somam para gerar o fenótipo obeso (PRENTICE, 2006). Dentre os principais fatores ambientais implicados no processo de obesidade temos a alimentação desbalanceada e a inatividade físicas. Nas últimas décadas alimentos altamente energéticos ficaram disponíveis em grande quantidade para a população do planeta. Juntamente com o aumento dessa disponibilidade de alimentos ricos em calorias vazias houve um aumento da prevalência da obesidade no mundo, sugerindo que, um aumento no consumo de alguns alimentos específicos ou determinados nutrientes, principalmente os macronutrientes como carboidratos, proteínas e gorduras, acompanham o aumento do processo

de obesidade (BREHM; D'ALESSIO, 2014; HILL; PETERS, 1998). Por outro lado, com a maior disponibilidade de tecnologias como, automação de processos, uso de transportes motorizados, dentre outros, contribuiu para um estilo sedentário típico da população ocidental, no qual a inatividade física constitui um sério problema de saúde pública, uma vez que está associada com um aumento no desenvolvimento de certas doenças crônicas de alta morbimortalidade (BREHM; D'ALESSIO, 2014; COHEN-COLE; FLETCHER, 1992).

A obesidade e comorbidades associadas a ela implicam em uma diminuição da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos, podendo levar a uma redução significativa nos anos vividos, dependendo do grau de obesidade apresentado (FONTAINE; BAROFISKY, 2001)

No Brasil, a obesidade cresceu 46% em dez anos. Dados mais recentes mostram que 20,3% da população brasileira encontram-se obesa, não havendo diferença entre os sexos, e 55,4% da população apresenta sobrepeso, sendo a condição de sobrepeso um pouco maior entre os homens (57,1%) do que entre as mulheres (53,9%) (BRASIL, 2019). Esse aumento nos casos gera um gasto substancial para país. Estima-se que de 9,1% dos gastos com a saúde no mundo são devidos às doenças relacionadas à obesidade. Pessoas obesas e com sobrepeso podem gerar um gasto com saúde de 6% a 45% maior do que pessoas eutróficas (WITHROW; ALTER, 2011). Segundo BAHIA; ARAÚJO, 2014, o sistema único de Saúde gasta cerca de R\$ 3,6 bilhões por ano com o tratamento dessas doenças, sendo R\$ 2,4 bilhões com tratamento hospitalar e R\$ 1,2 bilhões com tratamento ambulatorial.

## 2.2. OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

A obesidade é considerada uma doença inflamatória, sendo caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo branco (TAB), que pode ser evidenciada pela elevação dos marcadores e citocinas inflamatórias nesses indivíduos, além da presença de macrófagos pró-inflamatórios infiltrados no TAB, causada, principalmente, pela hipertrofia e hiperplasia do tecido (CANCELLO; CLE, 2006; SUN *et al.*, 2011).

A hipertrofia dos adipócitos leva a uma compressão dos vasos sanguíneos, impedindo o suprimento adequado de oxigênio levando a hipóxia e morte de alguns adipócitos o que desencadeia uma resposta inflamatória e a expressão de genes pró-inflamatórios, através da ativação das vias do fator de transcrição nuclear NFkB (FRONT *et al.*, 2003; SCHENK *et al.*, 2008).

A elevação dos marcadores inflamatórios em indivíduos obesos seria uma consequência da produção destes pelos próprios adipócitos, uma vez que a adipogênese implica

na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, os quais secretam adipocinas que podem ter efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (SCHO; SALZBERGER, 2007; SUN *et al.*, 2011).

Todo esse processo leva a um tecido adiposo disfuncional que apresenta mudanças na sua composição celular ocorrendo um aumento na secreção de citocinas quimiotáticas como MCP-1 e IL-8 que irão recrutar macrófagos pró-inflamatórios, que por sua vez, produzirão mais citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, importantes no desenvolvimento de resistência insulínica (PATTI; KAHN, 1998 SUGANAMI; OGAWA, 2010).

Existem outros fatores que podem desencadear o processo inflamatório no tecido adiposo na condição de sobrecarga nutricional como a ativação dos receptores tipo Toll 4 (POULAIN-GODEFROY *et al.*, 2010). A ativação dos receptores TLR4 por ácidos graxos ativam quinases e fatores transcricionais intracelulares responsáveis pela imunidade inata com consequente liberação de quimiocinas e citocinas (HWANG, 2001).

Adipocinas como a leptina, adiponectina e resistina também estão implicadas no processo inflamatório da obesidade (ADAMCZAK; WIECEK, 2013). A leptina é o hormônio responsável pela regulação do nível de energia, consumo de alimentos e mediadores inflamatórios. Devido ao aumento na massa de adipócitos, indivíduos obesos possuem altas concentrações de leptina na corrente sanguínea, porém estes possuem uma resistência periférica ao hormônio que perde, dessa forma, seus efeitos benéficos, passando a comprometer a saúde do indivíduo (SCHUSTER, 2010).

A resistina induz a expressão de moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), além de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 (QI *et al.*, 2008).

A adiponectina, por sua vez, possui poder protetor por possuir propriedade anti-inflamatória que ocorre através da supressão do fator nuclear kappa B (NFkB) em macrófagos e monócitos. A supressão do NFkB suspende processos induzidos pelo TNF- $\alpha$  (inflamação/adesão de monócitos). No entanto, níveis reduzidos são encontrados na maioria dos estados de obesidade (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005; LORENZO; FERNA, 2008).

### 2.3. MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal (TG) é o sítio mais densamente povoado por microrganismos no corpo humano. Há uma estimativa que o conteúdo luminal contenha aproximadamente  $10^{14}$  células bacterianas e arqueias por grama de conteúdo luminal, além de fungos, vírus e

protozoários. Estes microrganismos apresentam uma relação de anfibiose com o hospedeiro (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

As bactérias presentes nesse sítio pertencem, provavelmente, a mais de 1800 gêneros e de 15000 a 36000 espécies, distribuídas em mais de 50 filos diferentes, de maneira não homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal, sendo o colón a parte que contém a maior quantidade de microrganismos, devido ao grande aporte de nutrientes, ausência de secreções, pequeno número de placas de peyer e peristaltismo lento (SEKIROV *et al.*, 2010; WALTER; LEY, 2011).

Bactérias anaeróbias dominam a composição da MIH em uma ordem de magnitude até três vezes superior aos aeróbios facultativos e aeróbios, sendo a grande maioria não cultiváveis fora do ambiente intestinal (SEKIROV *et al.*, 2010).

Em indivíduos saudáveis os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam mais de 90% do total de bactérias, seguido por Actinobacteria, Proteobacteria, Synergistetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria e Euryarchaeota, representando um pequeno percentual da nossa microbiota (ARUMUGAM *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2010; TAGLIABUE; ELLI, 2013).

A composição da MIH é distinta entre os indivíduos, sendo em parte definida por fatores intrínsecos ao sujeito como a genética, e em outra parte determinada por características ambientais e individuais como o modo de nascimento, idade e hábitos alimentares (DAVE *et al.*, 2012; HMP, 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, 2014). A presença de bactérias na placenta de indivíduos saudáveis (AAGAARD, 2014), no cordão umbilical (JIMONEZ *et al.*, 2005) e no mecônio (GOSALBES; LLOP; VALL, 2012), sugere que o contato do feto com microrganismos é um fenômeno fisiológico, porém a importância desse fenômeno para o desenvolvimento da microbiota intestinal da criança precisa ser, ainda, elucidada (COLLADO *et al.*, 2016).

No momento do parto, os bebês são expostos a uma infinidade de microrganismos e rapidamente são colonizados pelos microrganismos aos quais tiveram contato pela primeira vez (FILIPPO *et al.*, 2010). 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 cesárea, desenvolvem uma microbiota inicial

parecida com a da pele, composta principalmente por *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* (CLEMENTE *et al.*, 2012).

No período pós-natal, o tipo e a duração da amamentação, estado de saúde e uso de antibióticos também são impactantes (CLEMENTE *et al.*, 2012). Há evidências 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 (ANGELAKIS *et al.*, 2012).

Em comparação à microbiota intestinal adulta, os lactentes apresentam maior variabilidade da composição microbiana, abrigando menos espécies com menor estabilidade. Entre 2 e 3 anos de idade, o ecossistema passa a ser estável e comparável ao de um adulto, dominado pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes (ANGELAKIS *et al.*, 2012).

Durante a idade adulta a microbiota é bastante estável, podendo sofrer modificações em situações específicas ao longo da vida. À medida que os indivíduos envelhecem, a MIH volta a sofrer modificações (BLOTTIE`RE, 2015). Observam-se redução na população de *Bacteroides*, *Bifidobacteria* e menor produção de ácidos graxos de cadeia curta, assim como crescimento de anaeróbios facultativos, tais como *Fusobacteria*, *Clostridia*, *Eubacteria*, e maior atividade proteolítica (WOODMANSEY, 2007).

As bactérias que colonizam o TG são determinantes na manutenção da homeostase do hospedeiro. Dentre as funções exercidas por elas destaca-se: i) proteção, impedindo a instalação de microrganismos não benéficos, formando uma barreira através da ocupação de sítios de adesão celulares da mucosa (WANG *et al.*, 2017); ii) função nutricional através da digestão de substratos que chegam ao lúmen, especialmente carboidratos, fermentados em ácidos graxos de cadeia curta que são fontes de nutrientes para os colonócitos. A microbiota do TGI sintetiza vitamina K e vitamina do complexo B que são úteis e importantes para o metabolismo do indivíduo (NICHOLSON *et al.*, 2013); iii) função imunomoduladora pela ativação do sistema imune pelo tecido linfóide intestinal que reconhece as espécies e antígenos que são benéficas ao hospedeiro, procedendo, assim, uma resposta de tolerância imunológica, mantendo o sistema imune intestinal pronto para ter resposta ágil e de maneira pertinente a uma invasão por bactérias não benéficas (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013).

Apesar da variabilidade interpessoal na composição da massa microbiana intestinal, o microbioma é funcionalmente equivalente na maioria dos seres humanos. 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. 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. (QIN *et al.*, 2010).

## 2.4. MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE

A homeostasia do ecossistema intestinal é determinada pelo equilíbrio entre estes três componentes: microbiota, permeabilidade intestinal e imunidade. Qualquer fator ou evento que afete um desses componentes repercute sobre os demais e pode impactar negativamente sobre o organismo inteiro (BRUNSER; GOTTELAND, 2010).

Nas últimas décadas, estudos consolidaram as evidências da associação da microbiota com o excesso de peso a partir de modelos animais e também humanos (CANI *et al.*, 2007; LEY *et al.*, 2006, 2005).

Os mecanismos envolvidos na relação entre microbiota (e sua composição) e o ganho de peso ainda não estão totalmente claros, mas alguns mecanismos e mediadores foram propostos para explicar como a composição da microbiota pode influenciar a gênese de doenças relacionadas ao metabolismo energético (WOTING; BLAUT, 2016).

### 2.4.1 Fasting Induced Adipose Factor – FIAF

O Fasting Induced Adipose Factor (FIAF) é um inibidor da lipase de lipoproteína (LPL), produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo. A LPL é uma enzima que hidrolisa triglicerídeos e estimula o seu armazenamento nos adipócitos. A MI está implicada na inibição seletiva desse hormônio, aumentando, dessa forma, a atividade da LPL que determina a maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (BACKHED *et al.*, 2004).

Estudo desenvolvido por DING *et al.*, 2004, mostrou que camundongos *germ free* posteriormente colonizados, apresentaram aumento do peso corporal, das concentrações de triglicerídeos hepáticos e da expressão de proteínas responsáveis pela adipogênese 14 dias após a colonização intestinal. Outro estudo que investigou animais FIAF- deficientes mostrou que, quando esses animais eram alimentados com dieta ocidental, ganharam mais peso corporal que animais *wild-type*, além de maiores concentrações de leptina e insulina, comprovando a importância do FIAF na adiposidade (MANCHESTER; SEMENKOVICH; GORDON, 2007).



#### 2.4.2 Monofosfato-Adenosina Proteína Quinase Ativada (Amp-Q)

Outro mecanismo proposto no envolvimento da microbiota no processo de obesidade é o da via da 5' -monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q), que é uma enzima ativada pela adenosina monofosfato (AMP) e que regula o metabolismo energético celular. 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 apetite (MANCHESTER; SEMENKOVICH; GORDON, 2007). Quando inibida, os processos anabólicos são ativados enquanto os catabólicos são inibidos (TILG *et al.*, 2011).

Estudo utilizando camundongos *germ-free* que foram submetidos a uma dieta hipercalórica mantiveram peso baixo, fato atribuído à elevação da atividade da AMP-Q no fígado e músculo esquelético e à maior oxidação de ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina (MANCHESTER; SEMENKOVICH; GORDON, 2007). A presença da microbiota suprime a oxidação de ácidos graxos muscular via mecanismos que envolvem a inibição da AMP-Q e, portanto, favorecem a adiposidade corporal e a geração de resistência à insulina (KOLA; HARVEY, 2008).

#### 2.4.3 Eixo Cérebro-Intestino

Outra linha de pesquisa refere-se ao impacto que a microbiota intestinal pode exercer no comportamento alimentar e no sistema nervoso central (SNC), de modo a influenciar a regulação central do apetite e saciedade (CANI *et al.*, 2010).

A MIH produz enzimas capazes de digerir fibras que o nosso organismo sozinho não conseguiria. Os polissacarídeos não digeríveis são metabolizados a monossacarídeos e a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente propionato, acetato e butirato, que, por sua vez, são importantes fontes de energia. Por esse motivo, AGCC podem fornecer calorias adicionais quando oxidados pelo hospedeiro e favorecer o ganho de peso na forma de gordura corporal (KAJI; KARAKI, 2014).

Modelo de estudo com camundongos obesos mostrou que esses animais possuem uma microbiota com alta capacidade sacarolítica, que irão fermentar os polissacarídeos não digeríveis da dieta, produzindo mais AGCC e monossacarídeos que são absorvidos no intestino, dessa forma, o conteúdo energético excretado nas fezes é menor, dependendo da composição da microbiota (FERNANDES *et al.*, 2014; TURNBAUGH *et al.*, 2006a).

Os AGCC atuam, também, como mediadores químicos que transmitem informações do lúmen intestinal para o resto do corpo. Eles se ligam aos receptores acoplados à proteína G, Gpr41 e Gpr43, também denominados de receptores de ácidos graxos livres (*free fatty acids receptors* – FFAR), FFAR2 e FFAR3, respectivamente, que são expressos pelas células L do epitélio intestinal. As células L são células enteroendócrinas presentes no íleo e no colón, produtoras do peptídeo YY (PYY) e do peptídeo semelhante ao glucagon (*glucagon-like peptide*, GLP-1) (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012; KAJI; KARAKI, 2014; ULVEN; SMITH; CHANG, 2012). O peptídeo YY é um hormônio que age inibindo a secreção gástrica, esvaziamento gástrico, contração da vesícula biliar e aumenta o tempo de trânsito gastrointestinal. Dessa forma, ao serem ativadas, estas células aumentam a produção de PYY, fato que favorece a redução da motilidade intestinal e propicia maior absorção de nutrientes do lúmen intestinal, em especial dos ácidos graxos de cadeia curta, que são substratos para a lipogênese no fígado (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012).

Estudo em camundongos Gpr41<sup>-/-</sup>, com ou sem microbiota intestinal, apresentaram menor peso que camundongos Gpr41<sup>+/+</sup>, apesar do mesmo consumo alimentar, sugerindo que a ausência do receptor esteja ligada a uma menor produção do PYY, conseqüentemente a uma maior velocidade no trânsito gástrico com diminuição da absorção energética (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012).

#### **2.4.4 Lipopolissacarídeos de membrana de bactérias Gram negativas**

O lipopolissacarídeo (LPS) é um constituinte da parede celular de bactérias Gram negativas. É formado pelo lipídeo A (unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa) ligado a um polissacarídeo que contém um núcleo e uma série terminal de unidades repetidas (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O LPS também é denominado de endotoxina, pois possui efeito inflamatório. Somente é liberado quando as células são lizadas e é extremamente tóxico para os animais, apresentando efeito em concentrações menores que 1 nM (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O lúmen intestinal é um reservatório de LPS e sua entrada para a circulação pode ocorrer por meio de duas vias: a difusão direta através do aumento da permeabilidade intestinal (devido ao afrouxamento do espaço paracelular intestinal) que pode ser causado por uma disbiose da microbiota, que por sua vez pode resultar em uma ativação de uma resposta imune de mucosa, levando a uma alteração da permeabilidade da mucosa intestinal (EARLEY *et al.*, 2015). Outro mecanismo proposto

seria por meio da absorção e incorporação de LPS na estrutura dos quilomícrons (MOREIRA; TEIXEIRA; GOUVEIAPELUZIO, 2012).

Dietas ricas em gorduras podem alterar a permeabilidade celular através da produção de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-4; IL-13, que favorecem a translocação do LPS para a circulação sanguínea, onde interagem com o complexo CD14 e receptores do tipo toll 4 (TLR4), presentes nas células da imunidade inata. Uma vez ativados os receptores TLR4 iniciam a geração de um sinal transmembranar que acaba com o estímulo da expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró- inflamatórias como TNF $\alpha$ , Il-6 e IL-1, gerando uma inflamação subclínica crônica que pode ter efeito na gênese da obesidade e do diabetes melitus tipo 2 (DM2) (CANI *et al.*, 2007; EVERARD; SC; CANI, 2013).

## 2.5 MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO PARA ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS.

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 devido, principalmente, às metodologias utilizadas. Inicialmente, as investigações eram basicamente observações microscópicas mas não permitia a diferenciação dos microrganismos. 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 microrganismos específicos. Entretanto, a grande maioria dos microrganismos componentes da MIH não podem ser facilmente cultivados e, assim, as técnicas baseadas em cultivo selecionavam apenas aqueles heterótrofos que melhor se adaptavam as condições de crescimento dos meios de cultivo (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006; WARD, D. M., WELLER, R., & BATESON, 1990).

Para contornar as limitações associadas à abordagem dependente de cultivo, diferentes técnicas de estudo das comunidades microbianas foram desenvolvidas. Algumas análises independentes de cultivo permitem o acesso ao genoma de toda a comunidade microbiana de uma amostra, possibilitando a análise de dezenas de espécies de maneira simultânea e não apenas o estudo de algumas espécies individualmente (HANDELSMAN; HANDELSMAN, 2004; WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010).

O principal alvo molecular para se estudar comunidades bacterianas é a sub-unidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA, que possui regiões de sequências de nucleotídeos

altamente conservadas, intercaladas por sequências altamente variáveis (V1-V9), o que permite o estudo de caracterização filogenética de grupos bacterianos (TANNOCK, 2002).

O sequenciamento de *amplicons* 16S rRNA, por exemplo, oferece a vantagem de ser relativamente barato, rápido e capaz de produzir leituras a partir de uma única região genômica que pode ser geralmente alinhada (SANSCHAGRIN; YERGEAU, 2014). No entanto, as sequências do gene 16S rRNA utilizadas na maioria dos estudos são sequências parciais, portanto, a seleção de *primers* adequados é fundamental para a acurácia desses estudos. Outra desvantagem é a ausência de valores pré-determinados que possam ser usados na determinação das espécies, uma vez que não existe definição universal para identificação de espécies através desse gene. Porém, para contornar este problema é utilizado o conceito de *Operational Taxonomic Units* (OTU), ou Unidade Taxonômica Operacional (PORETSKY *et al.*, 2014).

### **2.5.1 Metagenômica e metataxonômica**

A metagenômica é uma das formas de abordagem independente de cultivo que permite acesso à informação genética de comunidades microbianas. É baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas (HANDELSMANL *et al.*, 1998). Representa um conjunto de técnicas que incluem abordagens relacionadas à genômica que proporcionam uma visão menos enviesada do que a oferecida por técnicas dependentes de cultivo, tanto em relação à estrutura da comunidade (riqueza e distribuição de espécies) como sobre o potencial funcional (metabólico), dependendo da técnica utilizada (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010).

O termo metataxonômica é utilizado quando o sequenciamento baseia-se em no gene alvo 16S rRNA (MARCHESI; RAVEL, 2015). O sequenciamento de *amplicons* do gene 16S tem a vantagem de ser simples, barato e acessível. Para tal, amplifica-se, por PCR, a sequência 16S e se compara os resultados com um banco de dados conhecido. Dessa forma, é possível avaliar a comunidade bacteriana a partir da classificação taxonômica (SANSCHAGRIN; YERGEAU, 2014).

### **2.5.2 Sequenciamento de nova geração Illumina Miseq**

O sequenciamento metagenômico é uma técnica que permite identificar, na ordem correta, a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer as informações genéticas contidas nessa estrutura (HOODLESS, 2011).

A tecnologia de sequenciamento utilizada na plataforma Illumina, assim como o sequenciamento de Sanger, é realizada por síntese, utilizando a DNA polimerase e quatro nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos que emitem cores distintas. A diferença é que a clonagem dos fragmentos de DNA ocorre *in vitro*, ligados a uma plataforma sólida de vidro (*flow cells*). (GALLO; SILVA; CRISTINA, 2010). Esse processo é conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO *et al.*, 2006)

As moléculas de DNA clonadas nos *clusters* são sequenciadas de forma paralela utilizando uma abordagem de síntese de DNA do tipo *paired-end*, que proporciona o sequenciamento nas duas extremidades de *reads* com tamanho entre 200 e 500 nucleotídeos, e que emprega nucleotídeos especiais contendo terminador reversível e radical fluorescente, sendo quatro cores diferentes para distinguir entre as diferentes bases como citado anteriormente, com porção removível. A incorporação desses nucleotídeos impede que novas bases sejam incorporadas até que o terminador seja removido. A DNA polimerase utilizada também foi modificada para permitir a incorporação destes nucleotídeos modificados (BENTLEY, 2006).

Durante cada incorporação de um nucleotídeo, é feita a leitura da fluorescência para identificação da base adicionada através da medida de intensidade do sinal em cada ciclo. Em seguida, esse nucleotídeo é enzimaticamente clivado para remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo, permitindo a incorporação do próximo nucleotídeo (GALLO; SILVA; CRISTINA, 2010; METZKER, 2009). A posição e a sequência molde de cada cluster são deduzidas pela leitura da cor identificada em imagens de alta resolução obtidas a cada passo de adição dos nucleotídeos (BENTLEY, 2006).

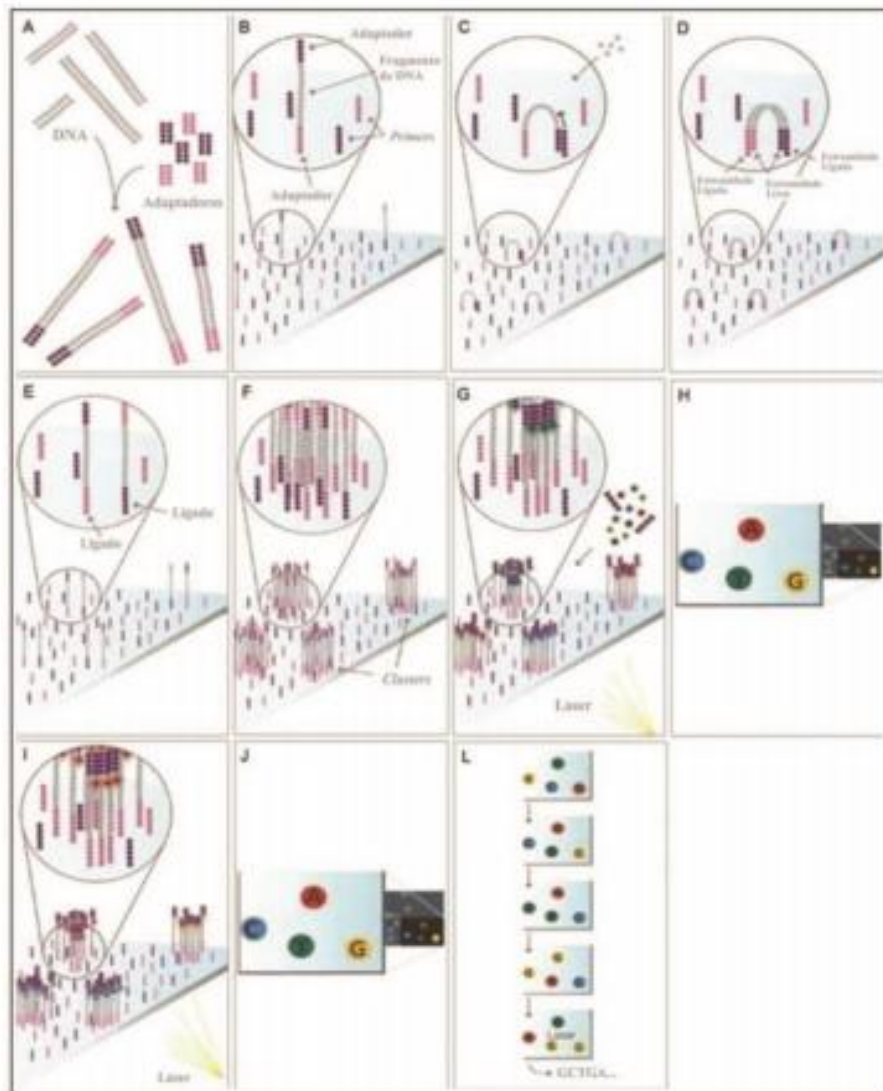
As etapas da análise de sequenciamento na plataforma Illumina Miseq estão resumidas na FIGURA 1.

Do exposto, como já relatado anteriormente e considerando-se:

- A importância da obesidade nos dias de hoje, considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde;
- A complexidade do ecossistema intestinal;
- As limitações das técnicas de FISH e PCR-DGGE utilizadas em estudo anterior.
- O surgimento da metagenômica como ferramenta importante no estudo da microbiota intestinal, bem como a redução dos custos e a consequente acessibilidade da técnica.

Foi proposto para este estudo, a utilização da metagenômica, pela técnica de sequenciamento de nova geração do gene 16sRNA, avaliar a comunidade bacteriana intestinal em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, para uma melhor compreensão da composição e da associação entre microbiota, obesidade e características clínicas e nutricionais.

Figura 1: Modelo esquemático do sequenciamento na plataforma Illumina.



Fonte: Adaptado de GALLO; SILVA; CRISTINA, 2010. (A) ligação dos adaptadores em ambas extremidades dos *amplicons*. (B) Ligação dos fragmentos de DNA fita simples às suas sequências complementares na superfície das *flow cells*. (C) Etapa de anelamento, com a formação das “pontes”, a partir da ligação do adaptador presente na extremidade livre do fragmento de DNA. (D) Amplificação das cadeias de DNA. (E) Etapa de desnaturação. (F) Formação dos clusters com milhares de sequências idênticas. (G) Adição dos nucleotídeos terminadores marcados e sua incorporação à cadeia pela DNA polimerase. (H) Excitação à laser e emissão de fluorescência em cada cluster é captada pelo sistema (I e J). Repetição do ciclo de incorporação, excitação à laser e detecção do nucleotídeo pelo sistema. (L) Determinação da sequência de bases em cada fragmento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a comunidade bacteriana intestinal representativa a partir de DNA metagenômico obtido de espécimes fecais de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir bibliotecas metagenômicas a partir do banco de DNA metagenômico obtido de espécimes fecais de indivíduos voluntários eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Realizar o sequenciamento das bibliotecas metagenômicas pela plataforma Miseq (Illumina);
- Analisar as diversidades alfa e beta comparativamente entre os grupos estudados;
- Analisar comparativamente os perfis taxonômicos e a abundância relativa dos principais filos e gêneros encontrados na microbiota intestinal dos indivíduos estudados;
- Determinar a microbiota *Core* dos grupos estudados;
- Correlacionar a estrutura da comunidade bacteriana, com os dados laboratoriais, antropométricos e de perfil nutricional, previamente avaliados, comparativamente entre os indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

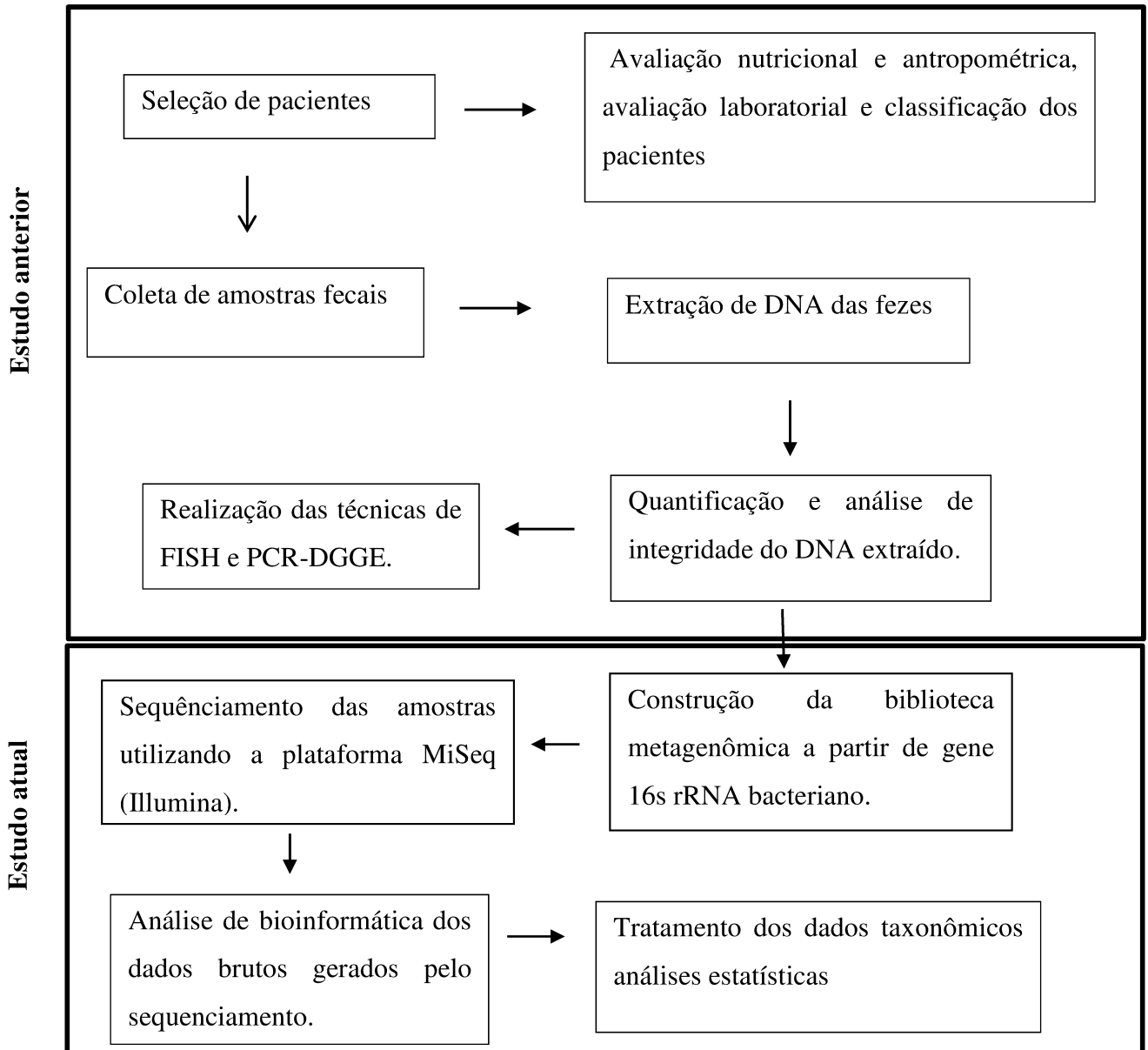
Este projeto dá continuidade a um estudo anterior voltado para o estudo da microbiota, sistema imunológico e obesidade em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Este estudo é do tipo transversal, prospectivo, descritivo e observacional, realizado com indivíduos adultos, de ambos os sexos, selecionados na comunidade e no ambulatório do serviço de nutrição do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os participantes foram divididos em três grupos distintos (eutróficos, com sobrepeso e obeso) de acordo com o índice de massa corporal (IMC). Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 60 anos e 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 (Parecer 479002/2013) (ANEXO A). Todos os voluntários foram informados a respeito dos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (ANEXO B). Os participantes foram submetidos à avaliação antropométrica e nutricional, feita através da aplicação de um questionário quantitativo de frequência alimentar adaptado (CARDOSO; STOCCO, 2000) (ANEXO C). Foram realizadas, também, coletas de espécimes clínicos (sangue periférico e fezes). Análises bioquímicas como glicemia, insulina, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, cortisol, creatinina, índices HOMA e hemoglobina foram avaliadas 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. As fezes foram coletadas em coletores universais estéreis, homogeneizadas e uma alíquota de 200mg separada em tubo tipo *ependorf* estéril e armazenada em freezer a -80°C, para posterior extração do DNA metagenômico (De Paula, 2016).

Para esta etapa de análise metataxonômica foi utilizado o banco de DNA metagenômico obtido de espécimes fecais dos indivíduos voluntários eutróficos, com sobrepeso e obesos, bem como os dados extraídos das avaliações, nutricionais, antropométricas e laboratoriais dos participantes (De Paula, 2016).



## 4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Fluxograma 1 – estratégia experimental.



Fonte: elaborada pelo autor

## 4.2 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA

As amostras de DNA foram amplificadas na região V3-V4 do gene 16S rRNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do tipo *paired-end* na plataforma Miseq (Illumina, USA). Inicialmente o DNA de todas as amostras foi diluído a uma concentração de 5ng/μL. A amplificação da região V3-V4 do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers*

341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 806R

(5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (KLINDWORTH *et al.*, 2013). Foram inseridos na região 5' dos *primers* uma sequência *overhang* que tem complementaridade de base pelos adaptadores fornecidos pelo kit Nextera XT da Illumina. A reação de amplificação encontra-se na tabela 1.

As condições utilizadas nessa PCR foram: desnaturação inicial à 95°C seguido de 25 ciclos de desnaturação à 95°C, anelamento à 56°C, extensão à 72°C, e extensão final à 72°C. A especificidade e eficiência da amplificação foram checadas em corrida no Bioanalyzer utilizando o kit Agilent DNA 1000 (Agilent, USA). Em seguida, os produtos amplificados foram purificados utilizando *beads* magnéticas da AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA).

O passo seguinte na construção das bibliotecas foi a ligação de um par de índice diferentes para cada amostra, bem como ligação dos adaptadores necessários para que a reação de sequenciamento possa acontecer. Os índice e adaptadores utilizados fazem parte do Nextera XT Index Kit (Illumina, USA). Essa ligação foi realizada por uma reação de amplificação de 8 ciclos, descrita na tabela 2.

Após ligação do Index, as amostras foram purificadas, novamente, utilizando *beads* magnéticas. Em seguida foi realizada uma corrida no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e chip Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent Technologies) para checagem do tamanho dos *amplicons* (500 Pb).

Tabela 1: Reação de PCR utilizada na amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.

Reagentes	Concentração Inicial	Volume (1x)
<i>Primer</i> 341F-mod	1 $\mu$ M	5 $\mu$ L
<i>Primer</i> 806R-mod	1 $\mu$ M	5 $\mu$ L
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	2X	12,5 $\mu$ L
DNA	5ng/1 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 2: Reação de PCR utilizada para ligação de índice durante a construção de bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina.

Reagentes	Volume
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 $\mu$ L
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 $\mu$ L
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 $\mu$ L
Água	10 $\mu$ L
DNA (produto da reação anterior)	5 $\mu$ L

Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA POR MISEQ ILLUMINA

As bibliotecas foram enviadas ao o Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-MG) onde realizou-se a quantificação das amostras por PCR em tempo real, utilizando o kit *KAPA Library Quantification* (Kapa Biosystems, USA).

Posteriormente as bibliotecas foram normalizadas para 4 nM por meio da seguinte fórmula:

Concentração em ng/ $\mu$ L

$$\frac{\text{Concentração em ng}/\mu\text{L}}{(660 \text{ g/mol} \times \text{tamanho médio da biblioteca})} \times 10^6 = \text{concentração nM}$$

Em seguida foi realizada a etapa de *pooling* onde misturou-se todas as bibliotecas normalizadas, depois as amostras foram sequenciadas em uma corrida única na plataforma Miseq (Illumina, USA) utilizando o kit MiSeq Reagent Kit v3- 600 Cycles, sendo o sequenciamento do tipo *paired-end* de 2x 300pb.

A preparação para o sequenciamento consistiu na desnaturação das bibliotecas com NaOH diluído, com tampão de hibridização, e em seguida, desnaturação por calor, de acordo com as especificações do fabricante. Foi adicionado, ainda, 5% do controle interno Phix. A fabricante Illumina recomenda o preparo de *pool* de bibliotecas visando densidade de geração de *cluster* dentro da margem de 800-1000 k/mm<sup>2</sup> para otimização dos reagentes. Para isso, foi calculado uma concentração de DNA já desnaturado de 4pM para a corrida.

#### 4.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

O *pipeline* utilizado para análise das sequências obtidas para os genes 16S rRNA foi o desenvolvido pelo *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (PYLRO *et al.*, 2014). Basicamente os passos realizados no *pipeline* foram os seguintes: (i) Os *reads* das sequências brutas obtidas através do sequenciamento do DNA total foram filtradas por qualidade e tratadas utilizando o programa FastQC; (ii) Filtro das sequências por qualidade e tamanho utilizando o programa Trimomatic v.0.32 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Na primeira etapa foi realizado o corte das 8 primeiras e últimas bases de cada sequência, seguida de uma varredura com filtro de qualidade percorrendo uma janela de 4 bases e um limiar de escala Phred 13. Todas as sequências foram truncadas com um tamanho de 100 pb. (iii) Dereplicação das sequências, ou seja, identificação das sequências únicas de modo que apenas uma cópia de cada sequência continuou sendo utilizada nas análises posteriores. O valor agregado de cada sequência única foi armazenado para posterior análise de abundância. A Dereplicação foi realizada utilizando o programa VSearch utilizando o comando *-derep\_fulllength* (ROGNES *et al.*, 2016). (iiii) Categorização da abundância e descarte de *Singletons*, que são sequências que apareceram uma única vez, utilizando, também o programa VSearch através do comando *-sortbysize*. (V) Clusterização das sequências em Unidades taxonômicas Operacionais (OTUs) com 97% de similaridade, no programa VSearch através do comando *-cluster\_size*. (vi) Filtro das possíveis

quimeras formadas, utilizando o banco referência através do comando *-uchimer\_ref* do programa VSearch. (vii) Construção da tabela de OTUs utilizando o comando *-usearch\_global*. (viii) Atribuição de taxonomia para as OTUs utilizando o método *uclust* do pacote QIIME v1.8.0 e o comando *assign\_taxonomy.py* (CAPORASO *et al.*, 2010), a nível de 97% de identidade. O banco de dados utilizado foi o SILVA (YILMAZ *et al.*, 2014). (ix) As sequências foram alinhadas através do comando *align\_seqs.py* para a construção da árvore filogenética, utilizando o comando *make\_phylogeny.py* do QIIME v1.8.0. (x) Utilizou-se o comando *core\_diversity\_analyses.py* para construção dos gráficos de taxonomia, alfa e beta diversidade.

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o software *GraphPad Prism* (GraphPAD Software Inc., San Diego, CA, USA) para a construção dos gráficos e análise estatística de *Kruskal-Wallis* seguida de teste de *Dunns* para comparar os três grupos estudados. Foi realizado, previamente às análises estatísticas o teste de *Grubs* para detecção de *outliers* utilizando a ferramenta *on line* disponível no site do software *GraphPad*.

Para comparação dos dados de Alfa-diversidade foi utilizado o teste T de student no programa Excel®.

Para análise de correlação linear de Pearson, seguida de correção de Benferroni, entre os valores absolutos dos grupo taxonômico filo, dados antropométricos, nutricionais e laboratoriais, utilizou-se o *software Past 3.0*.

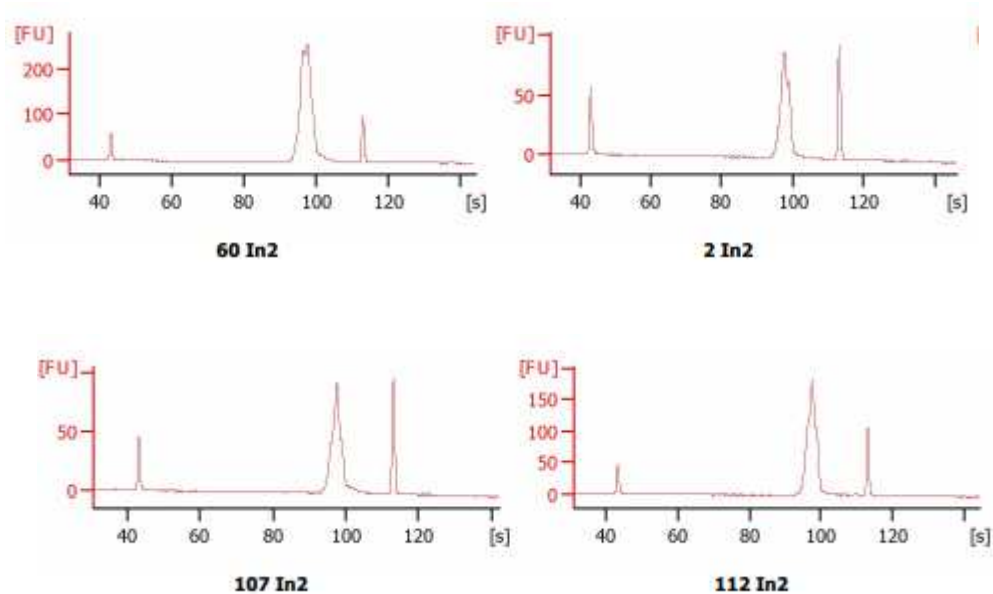
## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS METAGÊNOMICAS.

Das 72 amostras de DNA (24 amostras em cada grupo estudado) utilizadas para a construção da biblioteca metagenômica, apenas 66 apresentaram qualidade ótima exigida para análise de sequenciamento, sendo estas amostras divididas da seguinte maneira: 22 pertencentes ao grupo de eutróficos, 23 pertencentes ao grupo de indivíduos com sobrepeso e 21 pertencentes ao grupo de obesos.

A figura 2 representa os resultados de algumas amostras geradas pelo Bioanalyser 2100, onde o primeiro pico padrão corresponde a 15pb, o segundo pico corresponde a amostra testada, e se encontra em torno de 500pb, e o terceiro pico padrão corresponde a 1500 pb. Pode se observar nessa figura que as amostras selecionadas para posterior sequenciamento apresentam *amplicons* de tamanho esperado e sem nenhum pico significativo de produtos inespecíficos.

Figura 2: Análise em equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent) das bibliotecas do gene 16s rRNA do DNA metagenômico fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



Fonte: elaborada pelo autor

## 5.2 METADADOS

Os valores totais do consumo de calorias, macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídeos) e fibras, referentes aos últimos seis meses, por cada indivíduo estudado, e que foi utilizado para análise de correlação linear de Pearson, encontram-se no APÊNDICE 1. Os dados antropométricos encontram-se no APÊNDICE 2 e os parâmetros clínicos-laboratoriais na APÊNDICE 3. Os dados foram submetidos a teste de Grubs para identificação de *outlier* antes da realização da análise de Correlação.

## 5.3 RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO

Um total de 4070806 *reads* filtrados pela qualidade e com seus respectivos pares foram obtidos das 66 amostras analisadas. A contagem de *reads* entre amostras variou consideravelmente sendo, 8427 o valor mínimo, e 554465 o valor máximo de *reads* encontrado em uma amostra, apresentando uma média de 60758,299 *reads* e um desvio padrão de 102446,971. O número de *reads* em cada amostra encontra-se no APÊNDICE D.

### 5.3.1 Alfa-diversidade

Para análises de  $\alpha$ -diversidade foram utilizados os índices Chao-1, espécies observadas, Shannon e Simpson. O índice Chao-1 é um método não paramétrico e avalia a riqueza de espécies, baseando-se na abundância de OTUs únicas (*singletons*) e raras (*doubletons*) (CHAO, 1984), assim como as espécies observadas, que nada mais é que o número de OTU's encontrados. O índice de Shannon é utilizado para medir a diversidade de uma comunidade, baseado na abundância proporcional das espécies (OTUs). Já o índice de Simpson indica a probabilidade de dois indivíduos tomados ao acaso em uma amostra serem pertencentes à mesma espécie. Quanto maior o valor do índice, maior a diversidade (MELO, 2008). Estimativas de  $\alpha$ -diversidade foram realizadas com rarefação de 8000 sequências. Os resultados estão apresentados na tabela 3. A média geral de espécies observadas foi maior nos grupo de eutróficos e com sobrepeso. Esse resultado sugere uma maior riqueza desses dois primeiros grupos frente ao grupo de pessoas obesas, reforçado pela análise estatística do índice Chao-1. Não observamos diferença estatística significativa nos índices de diversidade Shannon e Simpson entre os grupos.

A análise de rarefação, que considera riqueza de OTUs e é bastante utilizada para comparação de amostras. Ilustra o número de sequências e o número de OTUs que essas sequências representam. Em nossa análise a curva de rarefação (figura 3) mostra que o esforço do sequenciamento, ainda que utilizando uma subamostragem de 8000 sequências, foi suficiente para representar a diversidade bacteriana, uma vez que as curvas dos três grupos estão próximas ao platô. Além disso, essa análise reforça a menor riqueza do grupo de indivíduos obesos.

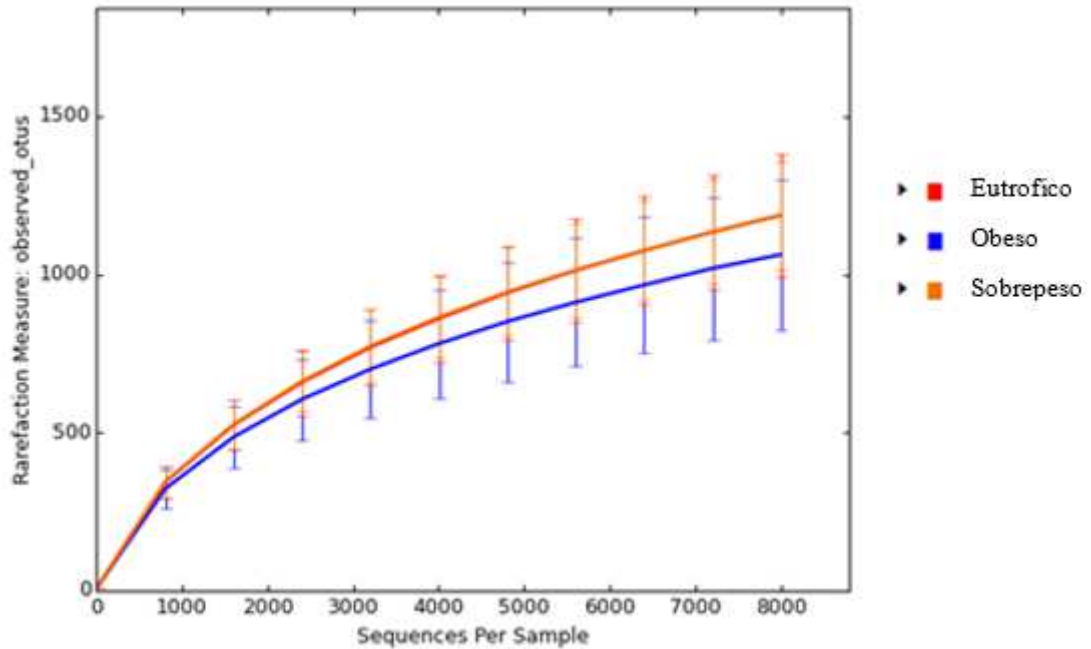
Tabela 3: índices de alfa-diversidade. Valores calculados para uma subamostragem de 8000 sequências.

Índice	Grupo			Valor de $p$		
	Eutrófico	Sobrepeso	Obeso	Eu x sob	Eut x Ob	Sob x Ob
Espécies	1187	1186	1063	-	-	-
Chao-1	1,59E+16	1,3227E+16	9,39E+15	0,105982	<b>0,001388</b>	<b>0,027943</b>
Simpson	0,987585	0,98750444	0,986437	0,484955	0,318308	0,332504
Shannon	7,62E+15	6,6075E+15	1,34E+16	0,115464	0,08495	0,051293

Fonte: elaborada pelo autor. Valores de  $p$  após análise de teste t de student com intervalo de 95% de confiança.



Figura 3: Curva de rarefação dos grupos estudados. Dados plotados com uma subamostragem de 8000 sequências.

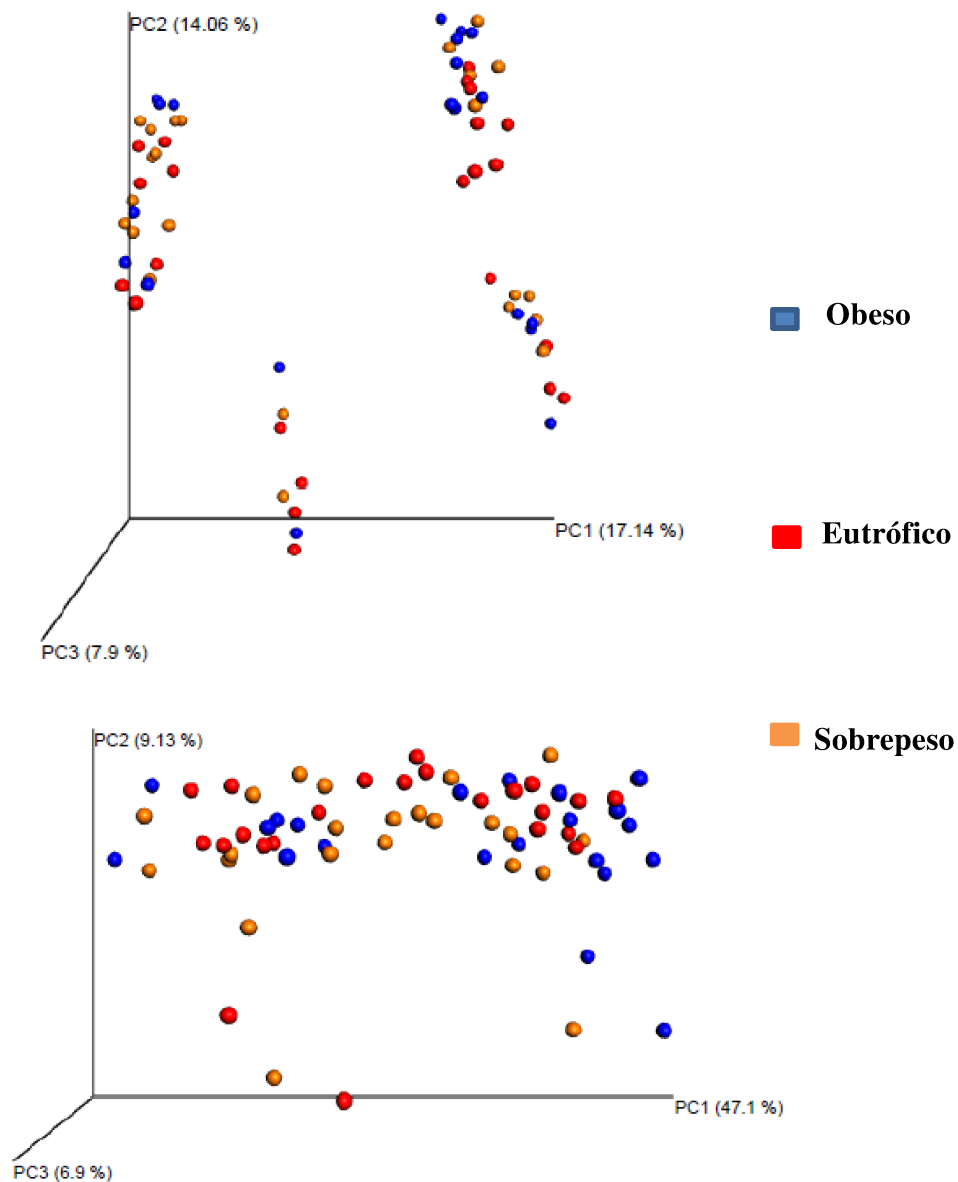


Fonte: elaborada pelo autor

### 5.3.2 Beta-diversidade

A análise de coordenada principal mostrou que não existe diferença na composição taxonômica dos grupos, tanto considerando a presença/ausência de cada OTU (qualitativo, Figura 4A), quanto considerando a abundância de cada uma (quantitativo, figura 4B). Embora o gráfico A apresente quatro grupos bem definidos em relação à composição de OTUs, eles são bastante homogêneos em relação à composição de indivíduos dos diferentes grupos estudados.

Figura 4: Análises de Coordenadas Principais (PCoA).



Fonte: elaborada pelo autor. A) PCoA não ponderado: a análise foi baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na presença/ausência das OTUs (qualitativo). B) PCoA ponderado: a análise foi baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na presença/ausência e abundância relativa das OTUs (quantitativo). Os eixos 1, 2 e 3 representam o percentual de dados que são explicados por cada coordenada.

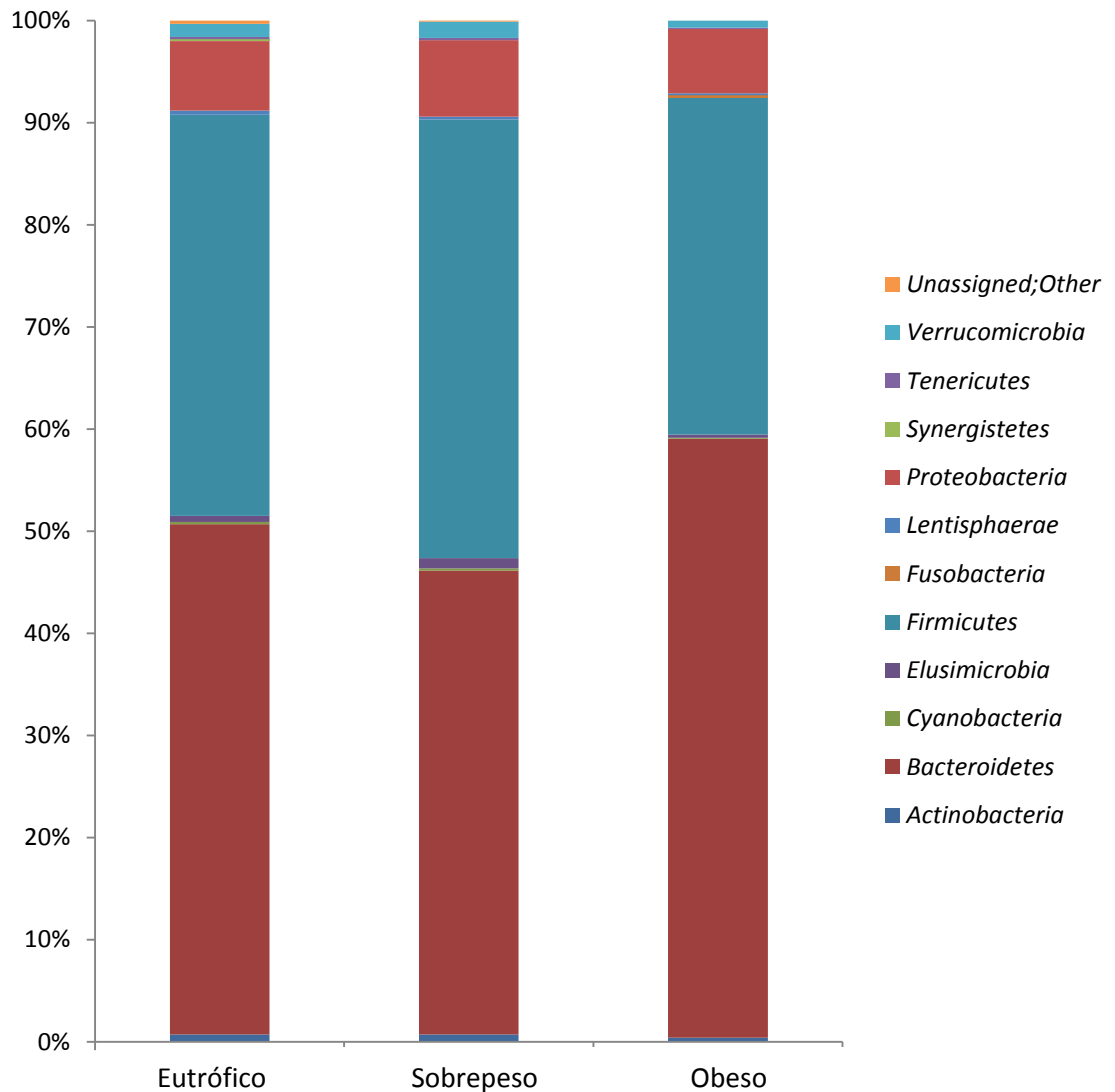
### 5.3.4 Perfil taxonômico

#### 5.3.4.1. Abundância relativa dos filos

De acordo com os resultados taxonômicos Bacteroidetes foi o filo mais predominante representando 50%, 45% e 58,6% da microbiota em pacientes eutróficos, com sobrepeso e

obesos, respectivamente. Firmicutes foi o segundo filo mais encontrado nos grupos de estudo com frequência de 39,3% nos eutróficos, 43% nos com sobrepeso e 33% nos obesos. O filo Proteobacteria foi o terceiro grupo mais frequente (6,8%; 7,5% e 6,3%); seguido de Verrucomicrobia (1,3%; 1,6%; 0,7%). O filo Actinobacteria foi o quinto mais frequente apenas nos grupo de eutróficos e obeso, apresentando abundancia relativa abaixo de 1% (0,7% e 0,4% respectivamente). No grupo com sobrepeso, o filo Elusimicrobia ocupou a quinta posição com uma abundancia relativa de 1% do total (figura 5)

Figura 5: Taxa de abundância relativa dos principais filios encontrados entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



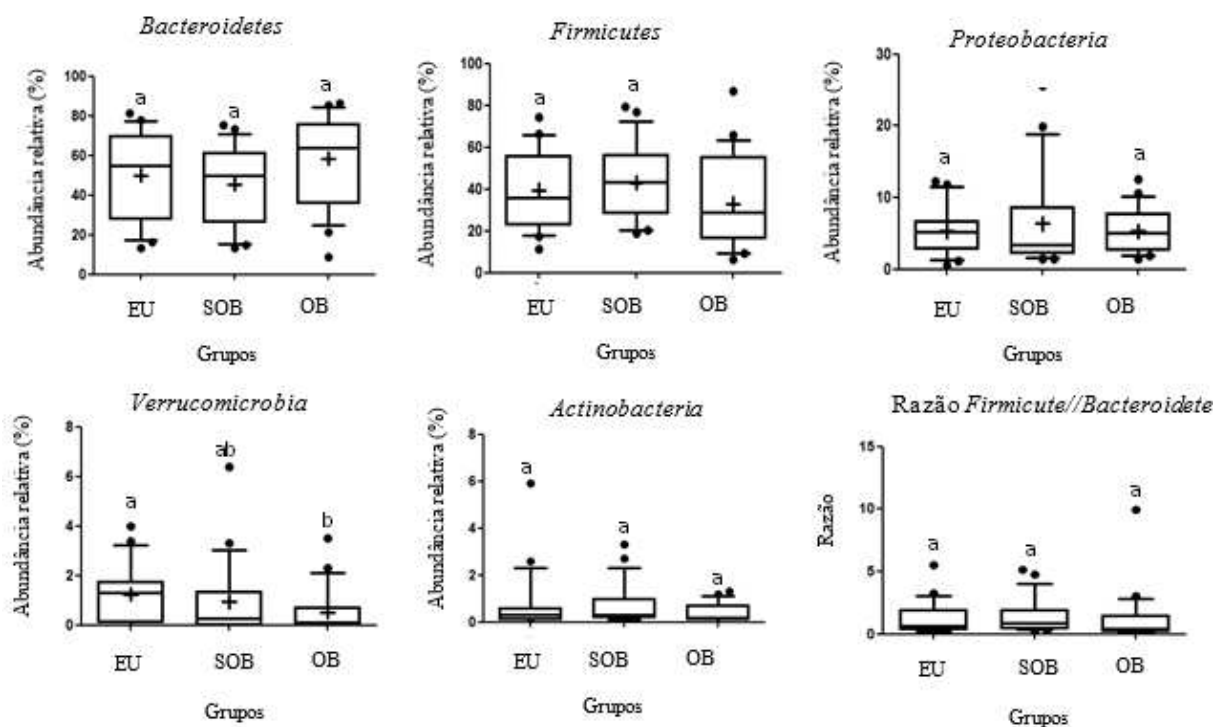
Fonte: elaborada pelo autor.

A análise comparativa dos principais filios encontrados, entre os três grupos, foi realizada usando o teste de kruskal-wallis seguida de teste de Dunns, e mostrou diferença

significativa apenas na abundância relativa do filo Verrucomicrobia entre os grupos de eutróficos e obesos (valor de  $P = 0,0448$ ). Não foi observada diferença estatística significativa entre a razão Firmicutes/Bacteroidetes nos três grupos (figura 6).

Dentre os filios de menor expressão, Synergistetes não foi detectado em nenhuma das amostras de fezes dos participantes do grupo com sobrepeso, e não houve diferença estatística significativa na média geral desse filo entre os grupos eutrófico e obeso.

Figura 6: Box-plot da abundância relativa dos principais filios encontrados nos grupos estudados.



Fonte: elaborada pelo autor. As barras representam os valores máximo e os mínimos. + representam a média e • representa os outliers. Letras distintas diferem entre si a nível de significância de 95% pelo de kruskal-wallis seguida de teste de Dunns ( $p < 0.05$ ). EU = eutrófico; SOB = sobrepeso; OB = obesos

#### 5.3.4.1 Abundância relativa dos principais gêneros e outros grupos

Foram analisados gêneros bacterianos que estavam presentes em uma abundância relativa maior ou igual a 1%, e que foram encontradas em pelo menos 50% dos indivíduos de cada grupo estudado.

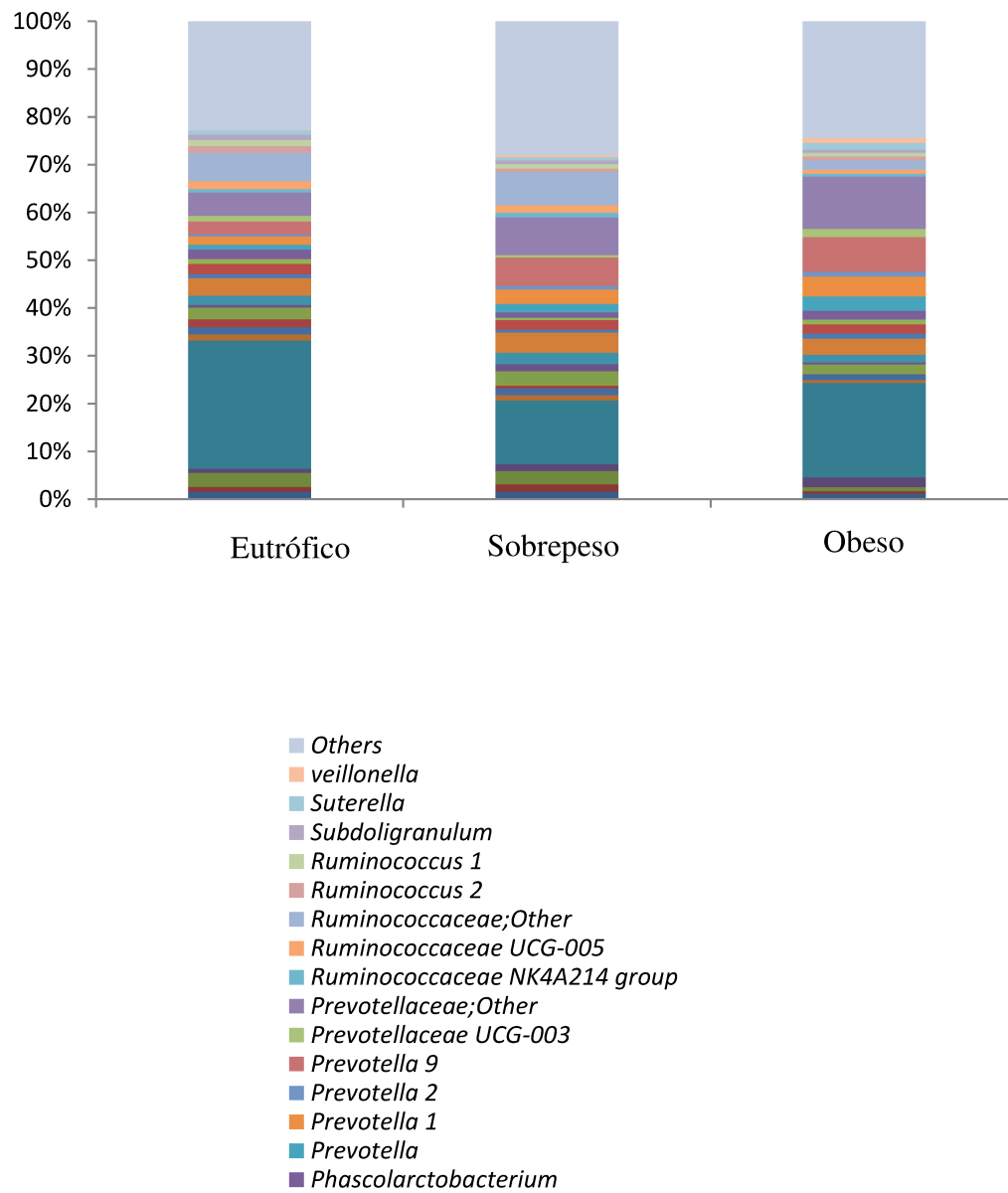
*Bacteroides* foi o gênero com maior abundância relativa nos três grupos, sendo a média do grupo eutrófico 26,8%; do grupo com sobrepeso 13,4% e no grupo obeso 19,8%. Porém não foi observada diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal–Wallis ( $p = 0,0611$ ).

A sequência dos 5 grupos taxonômicos de maior representatividade encontrados nos eutróficos é a seguinte: *Ruminococcaceae;Other* (5,9%); *Prevotellaceae;Other* (4,9%); *Lachnospiraceae;Other* (3,7%) e *Alistipes* (2,9%). No grupo com Sobrepeso: *Prevotellaceae;Other* (7,9%) *Ruminococcaceae;Other* (7,0%) *Prevotella 9* (5,9%) *Lachnospiraceae;Other* (4,2). No grupo de obesos: *Prevotellaceae;Other* (10,9%); *Prevotella 9* (7,3%); *Prevotella 1* (4,2%); *Lachnospiraceae;Other* (3,4%).

A abundância relativa quanto aos gêneros e outros grupos taxonômicos encontrados nos eutróficos, com sobrepeso e nos obesos está representada na figura 7.

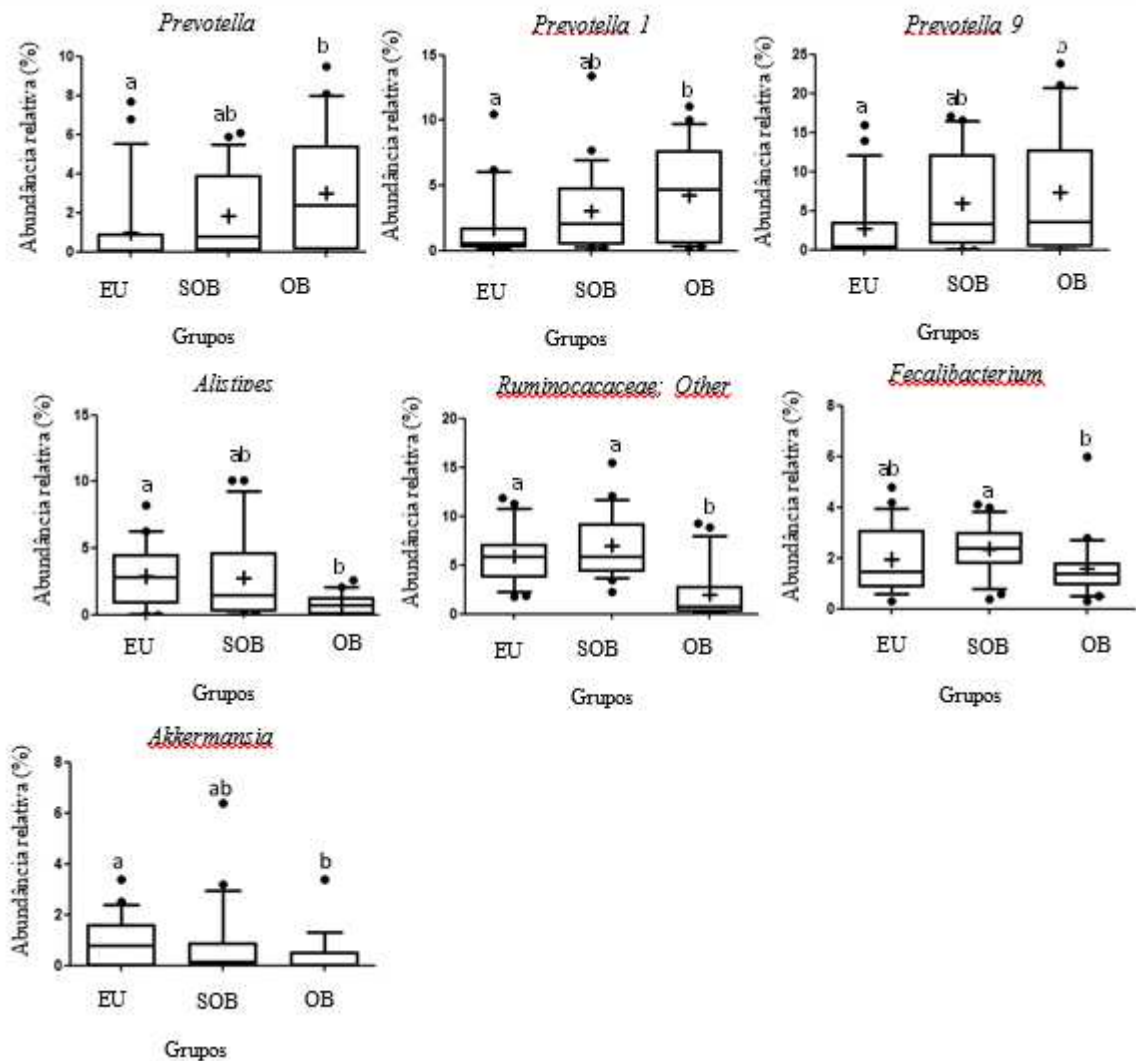
A análise dos gêneros bacterianos e outros grupos mostrou que a composição microbiana diferiu significativamente entre eutróficos e obesos em relação à *Prevotella* ( $P = 0,0228$ ), *Prevotella 1* ( $P = 0,0291$ ), *Prevotella 9* ( $P = 0,0178$ ), *Alistipes* ( $P = 0,0030$ ) e *Rumicococaceae;Other* ( $P = <0,0001$ ) e *Akkermansia* ( $p = 0,0188$ ), Entre Sobrepesos e obesos foi encontrado diferença estatística entre *Alistipes* ( $P = 0,0030$ ), *Rumicococaceae;Others* ( $P = <0,0001$ ) e *Fecalibacterium* ( $P = 0,0296$ ). Entre os grupos eutrófico e com sobrepeso não foi encontrada nenhuma diferença. (Figura 8)

Figura 7: Taxa de abundância relativa dos principais gêneros e outros grupos encontrados.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 8: Análise comparativa, por box-plot, da abundância relativa dos principais gêneros e outros grupos entre eutróficos, com sobrepeso e obesos.



Fonte: elaborada pelo autor. As barras representam os valores máximo e os mínimos. + representam a média e • representa os outliers. Letras distintas diferem entre si a nível de significância de 95% p elo teste de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunns ( $p < 0.05$ ). EU = eutrófico; SOB = sobrepeso; OB = obeso

### 5.3.5 Análise do core bacteriano intestinal.

O core bacteriano é caracterizado pelas espécies bacterianas comuns ou OTU's pertencentes a dois ou mais indivíduos associado ao mesmo habitat (SHADE; HANDELSMAN, 2012). A microbiota intestinal é um ecossistema complexo e um componente importante da homeostase do TGI e a disbiose desse ecossistema está associado a diversas patologias, dentre elas a obesidade. Dessa forma, é de interesse a elucidação dos mecanismos subjacentes a esse desequilíbrio, bem como a descoberta de biomarcadores presentes no TGI,

tanto de indivíduos saudáveis como de pessoas doentes ou que apresentem algum distúrbio (TAP *et al.*, 2009)

Um total de 29 OTU's foram identificadas como uniformemente representadas em todas as 66 amostras fecais (tabela 3), todas pertencentes às filos Firmicutes (23) e Bacteroidetes (6). Dentre os Firmicutes destacam-se bactérias da família *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* e dentre os Bacteroidetes destacam-se as *Paraprevotellaceae*, *Prevotellaceae* e *Bacteroidaceae*.

Analisando separadamente a microbiota core de cada grupo, o grupo eutrófico apresentou um número consideravelmente maior de OTU's - 188 no total – em relação ao grupo com sobrepeso que apresentou 83 OTU's comuns a todos os indivíduos, e ao grupo de obesos, que por sua vez apresentou apenas 53 OTU's comuns ao grupo.

O diagrama de venn abaixo (figura 9) nos mostra como essas OTU's estão distribuídas entre os indivíduos de maneira geral. Além das 29 OTU's comuns a todos os indivíduos, encontramos, também, 29 OTU's comuns entre os participantes dos grupos Eutrófico e com sobrepeso, 16 entre os grupos Eutrófico e Obeso e 5 entre os grupos com sobrepeso e obeso. Do total de 188 OTUS encontradas no sujeitos do grupo eutrófico, 144 foram exclusivas desse grupo, não aparecendo no demais. No grupo com sobrepeso 20 OTU's foram exclusivas, enquanto no grupo de obesos, 7 OTU's apareceram somente nesse grupo (tabela 4).

A microbiota core do grupo obeso está representada, pelos gêneros: *Prevotella*; *Faecalibacterium*; *Veillonella* e *Blautia*.



## core das 66 amostras de fezes analisadas

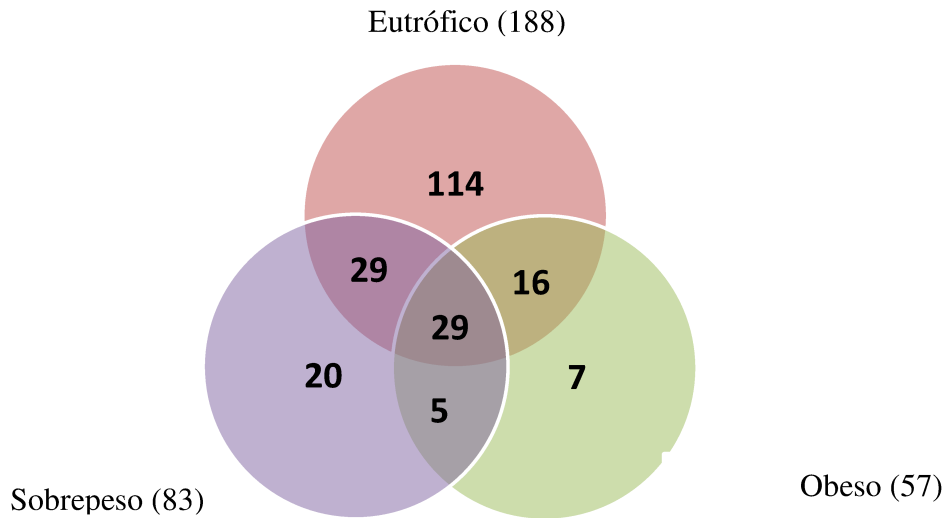
OTU	Táxon
OTU418478416217769	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU452905831453499	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU742208389502419	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU825863835218740	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU205142618194361	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU201935530713857	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__Bacteroidaceae', u'g__Bacteroides', u's__']
OTU951927877296537	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__[Paraprevotellaceae]', u'g__', u's__']
OTU705053422321288	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__[Paraprevotellaceae]']
OTU378319355051161	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__', u'g__', u's__']
OTU597271801965746	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__Prevotellaceae', u'g__Prevotella', u's__']
OTU617645652629704	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU56766341524628	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU553306258490490	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU981760762826446	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__Faecalibacterium', u's__prausnitzii']
OTU881315789570429	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU514095157648355	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']
OTU552808721163280	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU629518788195568	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__Faecalibacterium', u's__prausnitzii']

OTU111636903195858	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae']
OTU192441515852749	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__Bacteroidaceae', u'g__Bacteroides', u's__']
OTU595735153743344	[u'k__Bacteria', u'p__Bacteroidetes', u'c__Bacteroidia', u'o__Bacteroidales', u'f__[Paraprevotellaceae]']
OTU689397095355815	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__Faecalibacterium', u's__prausnitzii']
OTU489487195943134	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU666139330401893	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales']
OTU753857204700626	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU418465605849931	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__Blautia', u's__']
OTU651113601320144	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__', u's__']
OTU668943250238932	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Ruminococcaceae', u'g__Oscillospira', u's__']
OTU617874966362663	[u'k__Bacteria', u'p__Firmicutes', u'c__Clostridia', u'o__Clostridiales', u'f__Lachnospiraceae', u'g__', u's__']

---

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 9: Representação do Diagrama de Venn do core bacteriano nos grupos estudados



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 5: Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) pertencentes à microbiota core das amostras de fezes do grupo obeso.

OTU	Táxon
OTU108604229759077	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Bacteroidetes', u'D_2__Bacteroidia', u'D_3__Bacteroidales']
OTU247914312517437	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Bacteroidetes', u'D_2__Bacteroidia', u'D_3__Bacteroidales', u'D_4__Prevotellaceae', u'D_5__Prevotella', u'D_6__uncultured bacterium', u'D_7__', u'D_8__', u'D_9__', u'D_10__', u'D_11__', u'D_12__', u'D_13__', u'D_14__']
OTU370569602095251	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Bacteroidetes', u'D_2__Bacteroidia', u'D_3__Bacteroidales', u'D_4__Prevotellaceae', u'D_5__Prevotella', u'D_6__uncultured bacterium', u'D_7__', u'D_8__', u'D_9__', u'D_10__', u'D_11__', u'D_12__', u'D_13__', u'D_14__']
OTU466201231374444	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Firmicutes', u'D_2__Clostridia', u'D_3__Clostridiales', u'D_4__Ruminococcaceae', u'D_5__Faecalibacterium', u'D_6__uncultured bacterium', u'D_7__', u'D_8__', u'D_9__', u'D_10__', u'D_11__', u'D_12__', u'D_13__', u'D_14__']
OTU570729852219699	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Firmicutes', u'D_2__Negativicutes', u'D_3__Selenomonadales', u'D_4__Veillonellaceae', u'D_5__Veillonella']
OTU579827775676818	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Bacteroidetes', u'D_2__Bacteroidia', u'D_3__Bacteroidales', u'D_4__Prevotellaceae', u'D_5__Prevotella', u'D_6__uncultured bacterium', u'D_7__', u'D_8__', u'D_9__', u'D_10__', u'D_11__', u'D_12__', u'D_13__', u'D_14__']
OTU945950245442738	[u'D_0__Bacteria', u'D_1__Firmicutes', u'D_2__Clostridia', u'D_3__Clostridiales', u'D_4__Lachnospiraceae', u'D_5__Blautia', u'D_6__uncultured bacterium', u'D_7__', u'D_8__', u'D_9__', u'D_10__', u'D_11__', u'D_12__', u'D_13__', u'D_14__']

Fonte: elaborada pelo autor

### 5.3.6 Análise de correlação.

A análise de correlação de Pearson seguida de correção de Benferroni foi utilizada para avaliar a existência de correlação entre os metadados laboratoriais, nutricionais,

antropométricos e os principais filos encontrados na microbiota intestinal, separadamente por grupo estudado.

No grupo eutrófico, as correlações estatisticamente significantes observadas foram as seguintes: correlação positiva muito forte entre circunferência da cintura e circunferência abdominal (0,9224); correlação positiva forte entre colesterol e colesterol-LDL (0,8408); correlação positiva forte entre insulina e HOMA-IR) (0,8962); correlação negativa muito forte entre Firmicutes e Bacteroidetes (-0,9277)

No grupo com sobrepeso as correlações estatisticamente significantes observadas foram: correlação positiva forte entre circunferência da cintura e circunferência abdominal (0,7136); correlação positiva forte entre circunferência da cintura e relação cintura- quadril (0,8075); correlação positiva forte entre relação cintura quadril e glicose (0,7516); correlação positiva muito forte entre colesterol e colesterol-LDL (0,9441); correlação positiva muito forte entre insulina e HOMA-IR (0,9490); correlação positiva forte entre fibras e calorias ingeridas (0,8448); correlação negativa forte entre Firmicutes e Bacteroidetes (-0,8290); correlação negativa forte entre Bacteroidetes e Actinobacteria (-0,7502).

No grupo de obesos as correlações estatisticamente significantes observadas foram: correlação positiva forte entre índice de massa corporal e circunferência da cintura (0,7666); correlação positiva forte entre índice de massa corporal e circunferência abdominal (0,8696); correlação positiva forte entre índice de massa corporal e circunferência do quadril (0,8222); correlação positiva forte entre circunferência da cintura e circunferência abdominal (0,8761); correlação positiva muito forte entre insulina e HOMA-IR (0,9338); correlação positiva forte entre fibras e calorias ingeridas (0,8039); correlação negativa forte entre carboidratos e lipídeos (-0,8779) correlação positiva forte entre Firmicutes e Actinobacteria (0,7402); correlação negativa forte entre Firmicutes e Bacteroidetes (-0,8931).

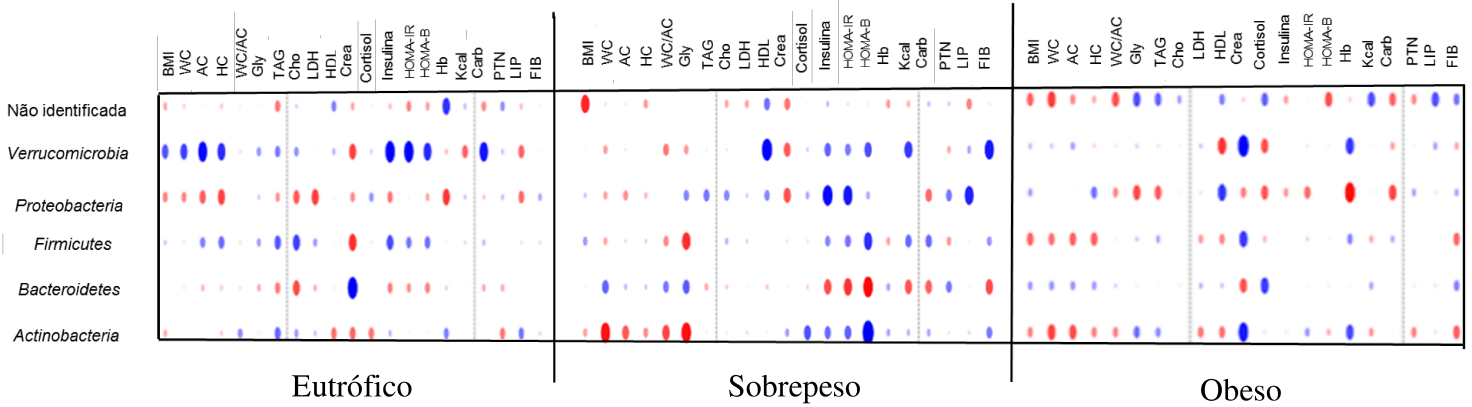
Em relação a correlação especificamente entre os metadados frente aos grupos bacterianos, não houve nenhuma correlação estatística significativa, mas podemos notar tendências de correlação diferentes entre os grupos (figura 11).

No grupo eutrófico os dados antropométricos- índice de massa corporal, circunferência da cintura e circunferência abdominal, circunferência do quadril- mostraram uma tendência de correlação positiva com o filo Verrucomicrobia e uma correlação negativa com Proteobacteria. Esses mesmos parâmetros. No grupo com sobrepeso, apresenta uma tendência de correlação negativa com o filo Actinobactéria. No grupo de obesos os dados antropométricos também mostraram uma tendência de correlação negativa com Actinobacteria e Firmicutes e com o grupo de bactérias não determinadas (figura 11).

Os dados laboratoriais, no grupo eutrófico, mostraram uma tendência de correlação positiva entre insulina, HOMA-IR e HOMA B e o filo Verrucomicrobia, e entre o parâmetro creatinina e o filo *Bacteroidetes*. Uma tendência de correlação negativa entre creatinina frente aos filos Firmicutes e Verrucomicrobia. No grupo com sobrepeso cortisol, insulina e índices HOMA mostram uma tendência de correlação positiva com Actinobactéria, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, e negativa com Bacteroidetes. O parâmetro HDL-colesterol mostrou uma tendência de correlação positiva frente ao filo Verrucomicrobia. No grupo de obesos destaca-se o parâmetro creatinina que mostrou uma tendência de correlação positiva com Actinobacteria, Firmicutes e Verrucomicrobia, e negativa com Bacteroidetes.

Com relação aos dados nutricionais, no grupo eutrófico, carboidrato mostrou uma tendência positiva com Verrucomicrobia. No grupo com sobrepeso calorias e carboidratos mostraram uma tendência de correlação positiva com Firmicutes e negativa com Bacteroidetes na mesma intensidade. Já o parâmetro fibra se destaca com uma tendência de correlação positiva com o filo Verrucomicrobia e lipídeos com uma tendência de correlação positiva com Proteobacteria. No grupo obeso se destaca apenas o parâmetro carboidrato apresentando tendência de correlação negativa com o filo Proteobacteria e positiva entre o parâmetro calorias e bactérias não identificadas.

Figura 10: Gráfico de correlação de correlação linear Pearson seguida de correção de Benferroni entre os metadados e os principais filos encontrados nos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.



Fonte: elaborada pelo autor. Abreviaturas: BMI: índice de massa corporal; WC: circunferência da cintura; AC: circunferência abdominal; HC: circunferência do quadril; WC/AC: relação circunferência quadril/abdômen. Glyc: glicose; TAG: triglicérides; Chol: colesterol; LDL: LDL-colesterol HDL: HDL-colesterol; Hb: hemoglobina; Kcal: calorias; Carb: carboidratos; PTN: proteínas; LIP: lipídeos; FIB: fibras. Círculos dentro do quadrado apresentam  $p < 0,05$ . Pontos azuis representam uma correlação positiva. Pontos vermelhos representam uma correlação negativa. Quanto maior e mais escuro maior o valor da correlação.

## 6 DISCUSSÃO

Análises filogenéticas baseadas em PCR e construção de bibliotecas metagenômicas de 16S rRNA têm sido bastante utilizadas na última década para a caracterização da microbiota intestinal (DETHLEFSEN *et al.*, 2008; LEY *et al.*, 2006). O preparo da amostra é de suma importância quando se usa técnicas moleculares. Atualmente existem vários kits comerciais para fazer a extração e a purificação das fezes frescas ou congeladas. Uma das primeiras etapas da extração do DNA é a lise. Sabemos que as bactérias possuem composição química e estrutura da parede diferentes, sendo mais ou menos susceptíveis à lise, dessa forma, a extração deve ser otimizada para construção de uma biblioteca efetiva (FURRIE, 2006).

Apesar dos esforços, as amostras de DNA metagênicos extraídos das fezes de 6 indivíduos participantes do estudo não geraram uma biblioteca ótima para posterior sequenciamento (originalmente 72 indivíduos participavam do estudo). Apesar das amostras estarem armazenadas em freezer a -80 C e a molécula de DNA ser bastante estável, quando comparada com outras amostras biológicas, a extração de DNA de amostra fecal é bastante difícil, pois possui uma microbiota bastante complexa, variáveis consistências e variáveis componentes endógenos e provenientes da dieta, além de inibidores da reação de PCR como os sais biliares, produtos de degradação de hemoglobina e polissacarídeos complexos (MCORIST; JACKSON; BIRD, 2002; MONTEIRO *et al.*, 1997).

A presença desses inibidores da PCR é variável entre os indivíduos. A dieta é um importante determinante da composição fecal e, conseqüentemente, pode influenciar o resultado da PCR nas amostras de fezes. Os inibidores da PCR nas fezes foram reduzidos em alguns indivíduos com uma dieta pobre em vegetais (MONTEIRO *et al.*, 2001).

A microbiota intestinal humana é um ecossistema complexo, composto por milhares de espécies bacterianas. Para melhor compreender e explorar o impacto da MIH na saúde e bem estar humana é necessário conhecer o conteúdo, diversidade e funcionalidade dessa microbiota em indivíduos saudáveis e doentes (QIN *et al.*, 2010). O conhecimento da composição, o processo de colonização e as interações da MIH com o hospedeiro estão sendo elucidados nas últimas décadas com a ajuda de técnicas independentes de cultivo. No passado, os estudos dependiam fortemente de abordagens baseadas na cultura, conhecidas agora por capturar apenas 10 a 20% da microbiota real presente (ECKBURG *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários estudos, em modelos humanos e animais, foram voltados à caracterização da microbiota intestinal em indivíduos obesos (DUNCAN *et al.*, 2008; LEY *et al.*, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2009).

No presente estudo, os índices de  $\alpha$ -diversidade utilizados foram os índices Chao-1, espécies observadas, Shannon e Simpson. O índice espécie observada indica o número de OTUs detectadas e foi menor, de maneira geral, no grupo de indivíduos obesos. O índice de Chao-1 estima a riqueza total de espécies e foi maior e estatisticamente significativo nos grupos eutróficos e com sobrepeso frente ao grupo obeso. Esses dados sugerem uma diminuição da riqueza de espécies na MIH de indivíduos com fenótipo de obesidade. Dado esse, reforçado, ainda, pela análise de rarefação que considera a riqueza de OTUs em função da cobertura do sequenciamento.

Indivíduos obesos tendem a ter uma dieta tipicamente ocidental rica em gorduras. Estudo desenvolvido por ZHANG *et al.*, 2012, no qual camundongos com uma dieta rica em gordura tiveram sua MI avaliada, mostrou um declínio significativo tanto na riqueza quanto na diversidade da microbiota dos animais após algumas semanas de uma dieta rica em gorduras. Depois da retirada da dieta, os parâmetros voltaram a subir e se igualar a dos animais com uma dieta com quantidades de gordura ideais. Porém, em nosso estudo, a média de consumo de lipídeos entre os grupos foram idênticas. Não podemos, inferir, dessa forma, que em nosso grupo amostral de obesos a diminuição na riqueza tenha sido uma consequência da ingestão excessiva de gordura.

Os índices de Shannon ( $H'$ ) e Simpson foram estatisticamente semelhantes nos três grupos. Esses índices consideram abundância de espécies. Os valores de  $H'$  são maiores quanto maior for a abundância e equitabilidade das OTUs nas amostras. Já o índice de Simpson irá retratar a probabilidade de que, numa mesma amostra, dois indivíduos escolhidos aleatoriamente pertençam a diferentes OTUs, sendo os valores mais altos retratam uma maior diversidade (KEYLOCK; LANE, 2005).

Para determinar a presença de diferença significativa na diversidade beta entre os três grupos os plots PCoA foram construídos com base nas matrizes de distância UniFrac ponderadas e não ponderadas. Procurou-se agrupar indivíduos pertencentes ao mesmo grupo. A variação explicada pelas variáveis nos diversos eixos de PCoA associados às análises de UniFrac não-ponderado foi baixa, inferior a 20% nos três eixos, mas apesar disso, notou-se a formação de 4 clusters bem definidos, porém os cluster são altamente heterogêneos, contendo indivíduos pertencentes aos três grupos estudados. Essa análise demonstra uma medida



qualitativa, apenas, diferenciando as comunidades pelos organismos que podem existir em cada amostra.

Ao levarmos em conta a abundância relativa das OTUs a partir da análise comparativa de diversidade das amostras pelo método UniFrac ponderado, foi possível observar uma variação mais alta apenas no eixo PCo1 e não foi possível observar agrupamento de indivíduos, apenas alguns poucos diferenciaram dos demais, ficando claro que não há formação de clusters quando se leva em conta a abundância das OTUs presentes em cada amostra.

O Projeto Microbioma Humano foi capaz de descrever os filos mais representativos da microbiota gastrointestinal, sendo eles, em ordem decrescente: Bacteroidetes (Gram -), Firmicutes (Gram +), Proteobacteria (Gram -) e Verrucomicrobia (Gram -) (HMP, 2012). A análise taxonômica dos principais filos presentes na MI dos três grupos de nosso estudo corroboram com os dados do Projeto Microbioma Humano.

Nas últimas décadas, vários estudos destacaram que a grande variedade de bactérias que colonizam o intestino humano possui relação direta na regulação de energia, dessa forma, fica evidente a importância desse fator ambiental em relação ao controle de peso corporal e a homeostase energética. Esse fato pôde ser comprovado por BACKHED et al., 2004, cujo estudo comparou os níveis de gordura corporal de camundongos normais frente a animais *germ-free*. 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 gnotobióticos, estes tiveram um aumento de 60% da gordura corporal em um curto período de tempo.

No geral, vários pesquisadores têm apresentado relações entre a obesidade e dois filos bacterianos dominantes, os Firmicutes e Bacteroidetes. O filo Firmicutes compreende 274 gêneros de bactérias predominantemente gram-positivas. Possui tanto gêneros com atividade imunomodulatória benéfica (*Clostridium*, *Lactobacillus*), como gêneros que induzem inflamação e que estão associados a algumas doenças crônicas (*Mollicutes*) (FURUHASHI, M., TUNCMAN, G., GÖRGÜN, C. Z., MAKOWSKI, L., ATSUMI, G., VAILLANCOURT, 2007). Alguns pesquisadores sugerem que alimentos com elevados teores de gorduras saturadas e poli-insaturadas proporcionam um ambiente propício para seleção deste filo. Por outro lado, a ingestão de fibras, frutas e hortaliças, proporciona o aumento da produção de derivados da fermentação de carboidratos resultando um ambiente desfavorável para elas. O aumento de Firmicutes estaria relacionado a um aumento da eficiência de extração de energia a partir da dieta, com conseqüente aumento de estocagem dessa energia em forma de tecido adiposo, auxiliando o ganho de peso (TURNBAUGH et al., 2006b).

O filo Bacteroidetes consiste principalmente de bactérias gram-negativas que modulam o sistema imune intestinal de forma benéfica. Formam um grupo com elevada diversidade filogenética e são descritos como bactérias competitivas, capazes de fermentar polissacáridos indigeríveis com formação de AGCC que podem fornecer até 10% de calorias quando a dieta é rica em fibras (JOHNSON *et al.*, 2016)

Especificamente, alguns estudos em humanos adultos, crianças e camundongos observaram uma mudança na abundância destes dois filios, tendo um aumento no filo Firmicutes e uma diminuição do filo Bacteroidetes, aumentando, dessa forma, a relação Firmicutes/Bacteroidetes (KOLIADA *et al.*, 2017; LEY *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2006b). Em nosso estudo, não observamos diferença estatística na abundância relativa filios Bacteroidetes, Firmicutes, e nem na razão Firmicutes/Bacteroidetes.

Os achados na abundância relativa desses dois filios não é unânime entre os estudos que correlacionam a microbiota intestinal e o estado de obesidade. DUNCAN *et al.*, 2007, analisaram a composição da microbiota intestinal humana de 19 voluntários obesos do sexo masculino submetidos a diferentes tipos de dieta durante quatro semanas. Foram coletadas amostras fecais no final de cada regime dietético e os resultados da pesquisa não evidenciaram mudanças nas contagens relativas dos Bacteroidetes.

Estudo desenvolvido por SCHWIERTZ *et al.*, 2010 analisou a composição bacteriana fecal e a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, e também não encontraram um aumento na proporção de Firmicutes nos indivíduos obesos e com sobrepeso. Em compensação encontraram um aumento de AGCC nas fezes de indivíduos com aumento de peso corporal. Membros de ambos os grupos produzem AGCC a partir de compostos dietéticos que escapam da digestão no intestino delgado, suprindo o hospedeiro com uma quantidade adicional de energia e, assumindo assim que não a proporção de Firmicutes e Bacteroidetes seria importante, mas sim a quantidade de AGCC produzida.

Cerca de 60% da energia consumida pelo epitélio colônico deriva dos ácidos graxos, principalmente butirato (SCHEPPACH, 1994). Propionato é largamente absorvido pelo fígado e é um bom precursor para a gliconeogênese, liponeogênese e síntese proteica. O acetato entra na circulação periférica para ser metabolizado pelos tecidos periféricos e é um substrato para síntese de colesterol (SCHEPPACH, 1994; WOLEVER, T. M. S., SPADAFORA, P., & ESHUIS, 1991).

Diversas razões podem ser responsáveis pelas diferenças observadas entre os estudos. A literatura aponta como as principais fragilidades metodológicas nos estudos de associação entre microbiota e obesidade o universo amostral que, na grande maioria dos estudos, é pequeno

e não levam em consideração as condições clínicas e nutricionais dos participantes. Além da metodologia, as variáveis intrínsecas aos participantes como etnia, sexo, idade, IMC, torna difícil a comparação entre os diferentes estudos, requerendo, dessa forma, alguma padronização na abordagem (TAGLIABUE; ELLI, 2013).

Vale ressaltar, também, que nosso estudo recrutou somente indivíduos saudáveis, sem doenças prévias, comprovadas pelas análises laboratoriais realizadas, incluindo aqueles que fazem parte dos grupos de sobrepeso e de obesos. Isto é importante para retratar uma possível mudança na microbiota causada pelo aumento de peso, sem a interferência de possíveis comorbidades associadas à obesidade, que por si só, podem resultar na modificação da microbiota e levar a resultados errôneos.

Dos principais filos componentes da MIH, nosso estudo mostrou diferença estatística significativa apenas no filo Verrucomicrobia, estando em menor quantidade no grupo obeso quando comparada ao grupo de eutróficos. Este filo é um membro do superfilo PVC (*Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae*) que inclui bactérias filogeneticamente relacionadas com características como a existência de um sistema de endomembrana complexo e dinâmico que, em alguns aspectos, os torna mais próximos para células eucarióticas. Inclui um pequeno número de gêneros isolados de água doce, solo e fezes de animais; *Akkermansia muciniphila* é o principal membro deste filo identificado em seres humanos (FUJIO-VEJAR *et al.*, 2017).

Assim como o filo Verrucomicrobia, o gênero *Akkermansia* pertencente a ele, também foi estatisticamente diferente entre os grupos de eutrófico e obeso, apresentando menor abundância no grupo de obesos.

*A. muciniphila* coloniza o intestino humano no início da vida e aumenta rapidamente com a idade, atingindo  $10^8$ /g de fezes em adultos (COLLADO *et al.*, 2007). É uma bactéria altamente especializada capaz de usar mucinas como única fonte de carbono e nitrogênio (DERRIEN *et al.*, 2011) e estimula a expressão de mucina e secreção de muco através um feedback positivo. Sua abundância é menor em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (PNG *et al.*, 2010). Uma menor abundância também foi relatada em estudos envolvendo animais e humanos obesos (ANJOS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2008). Este é um achado interessante considerando que este agente apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunoestimulantes. O Aumento nas contagens intestinais de *Akkermansia. muciniphila* em indivíduos obesos, através da administração de polifenóis ou prebióticos resultaram na melhora da função de barreira intestinal, endotoxemia, sensibilidade à insulina e no aumento da expressão do gene *Fiaf* intestinal (FUJIO-VEJAR *et al.*, 2017).

Dentre os principais gêneros encontrados, nosso estudo mostrou diferença estatística entre eutróficos e obesos nos gêneros *Prevotella*, *Prevotella 1*, *Prevotella 9*, *Alistipes*, *Rumicoccaceae*; *Others*, sendo *Prevotella*, *Prevotella 1*, *Prevotella 9* maiores nos obesos, *Alistipes* maior no grupo eutrófico e *Rumicoccaceae*; *Others* maior nos grupos eutrófico e com sobrepeso. Entre os grupos com sobrepeso e obeso *Fecalibacterium* foi estatisticamente diferente. Sendo maior no grupo com sobrepeso.

O gênero *Prevotella*, pertence ao filo Bacteroidetes, usa xilano, xilose, e carboximetilcelulose para produzir altos níveis de AGCC (JIANG *et al.*, 2015). Estudos revelam uma associação desse gênero com uma dieta rica em vegetais, sugerindo que a presença desses microrganismos seria benéfica ao hospedeiro, porém, outros estudos associaram o aumento de *Prevotella* no ecossistema intestinal a condições inflamatórias (DILLON *et al.*, 2015; SCHER *et al.*, 2013). Estudos anteriores mostraram também que a redução em *Bacteroides-Prevotella spp.* está relacionado a uma forte diminuição da endotoxemia metabólica e inflamação em camundongos com diabetes tipo 2 (LARSEN *et al.*, 2010). ZHU *et al.*, 2012 em estudo com crianças obesas sugeriu aumento da abundância do gênero *Prevotella* e diminuição de *Alistipes*, corroborando nosso trabalho.. Tanto a produção de AGCC quanto a endotoxemia provocada pela LPS da parede de bactérias gram-negativas, estão implicadas na relação MIH e obesidade.

*Prevotella* é um gênero com alta diversidade de espécies que possuem grande diversidade genômica entre linhagens. Na população humana, a grande variação entre as diferentes linhagens pertencentes a esse gênero torna difícil prever como ele atua no ecossistema intestinal. Para prever sua função é necessária uma compreensão mais refinada do potencial genético desse gênero, sua ecologia, interações com outros microrganismos e com seu hospedeiro (LEY, 2016).

*Alistipes* são bactérias comensais, pertencentes ao filo Bacteroidetes, e são indicativas de boa saúde gastrointestinal. VERDAM *et al.*, 2013, assim como nosso estudo, também demonstraram uma associação inversa entre alto IMC e a abundância de *Alistipes* no intestino.

A família *Ruminococcaceae* é uma das mais abundantes pertencentes à ordem *Clostridiales* encontrada no ambiente intestinal dos mamíferos. Está associada à manutenção da saúde intestinal. Têm a capacidade de degradar os componentes de celulose e hemicelulose do material vegetal, permitindo aos membros dessa família decompor substratos que não são digeridos pelo hospedeiro. Estes compostos são, então, fermentados e convertidos em ácidos graxos de cadeia curta. (principalmente acetato, butirato e propionato) que podem ser absorvidos e usados como energia pelo hospedeiro (BIDDLE *et al.*, 2013). Como discutido

anteriormente, a formação de AGCC pode estar implicada no processo de obesidade, porém, esse grupo é mais especializado na a degradação de material vegetal complexo, um dos motivos pelos quais podem estar em menor em indivíduos obesos, pois a base da alimentação desses indivíduos tende a ser pobre em vegetais e ricas em gorduras saturadas e carboidratos simples (LAURA *et al.*, 2015).

*Faecalibacterium* foi encontrada em maior abundância no grupo com sobrepeso. Esse gênero faz parte do filo Firmicutes e seu nível está correlacionado negativamente com marcadores inflamatórios, indicando que essa bactéria pode modular a inflamação sistêmica (comum ao diabetes e obesidade) e contribuir para a melhora do diabetes (TREMAROLI, V., & BÄCKHED, 2012). Em humanos, o gênero *Faecalibacterium* é dividido em dois filogrupos diferentes (CHATEL *et al.*, 2013). O microrganismo *Faecalibacterium prausnitzii*, uma das três maiores abundantes espécies bacterianas encontradas no intestino grosso humano adulto saudável, em particular, tem sido associada à redução da inflamação de baixo grau na obesidade e diabetes, independentemente de ingestão calórica (FURET *et al.*, 2010). Alguns estudos indicaram uma menor abundância dessa espécie em pacientes que são obesos e diabéticos (TREMAROLI, V., & BÄCKHED, 2012). No entanto, os níveis de *F. prausnitzii* foram significativamente maiores em crianças obesas do sul da Índia do que em participantes não obesos (BALAMURUGAN *et al.*, 2010). Devido às inconsistências na correlação de *F. prausnitzii* com a obesidade em diferentes estudos, o papel deste microrganismo ainda é incerto e requer mais estudos.

A microbiota *core* é caracterizada por membros da comunidade microbiana comuns em duas ou mais amostras associado ao mesmo habitat. Identificar as OTUs centrais é essencial para compreender a ecologia de consórcios microbianos em determinado ambiente, uma vez que, os microrganismos comuns podem ser críticos para a função daquele ecossistema (SHADE; HANDELSMAN, 2012).

O estudo da microbiota *core* do nosso trabalho, revelou a presença de 29 OTUs pertencentes a todos os indivíduos, sendo a grande maioria pertencente ao filo Firmicutes, e uma parcela pertencente ao filo Bacteroidetes. Já era esperado que a microbiota *core* da população estudada pertença a esses dois filios, uma vez que somam mais de 90% do total de toda microbiota intestinal bacteriana.

Nossos resultados mostram também que a microbiota *core* é mais diversa no grupo de eutróficos, apresentando 144 OTUs exclusivamente encontradas nesse grupo, seguida pelo grupo com sobrepeso, com 20 OTUs exclusivas e em seguida o grupo do obesos com apenas 7 OTUs exclusivas desse grupo. Podemos inferir, a partir desses dados, que indivíduos que estão

acima do peso, assim como na primeira infância, possuem uma microbiota *core* menos diversa quando comparada a de um indivíduo adulto saudável (BERGSTRÖM *et al.*, 2014; MATAMOROS *et al.*, 2013).

Conjuntos de dados da comunidade microbiana de amostras origem fecal descreveram padrões de associação do hospedeiro e fatores externos que podem moldar o microbioma intestinal. No caso do ser humano, como dito anteriormente, a dieta pode influenciar a composição da microbiota intestinal mais do que fatores genéticos, geográficos ou outros (EREN *et al.*, 2014).

Uma vez que Bacteroidetes e Firmicutes compõem a maioria dos microbiota intestinal, os pesquisadores estudaram seus papéis no metabolismo do hospedeiro (LÓPEZ-CEPERO; PALACIOS, 2015). HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 2002, mostraram que Bacteroidetes aumenta o processamento de nutrientes de dieta, regula positivamente o co-transportador de glicose SGLT-1, além de promoverem o aumento da absorção lipídica. Além disso, bactérias pertencentes a esse filo são capazes de melhorar a absorção de micronutrientes, como o cobre, através da regulação positiva da expressão do seu transportador CRT1. Estudos com o outro filo dominante do intestino, Firmicutes, provaram o seu papel no aumento da absorção de lipídeos. Os pesquisadores mostraram que peixes-zebra, quando exclusivamente colonizados com Firmicutes tiveram um aumento significativo na absorção de lipídeos e um aumento de transporte de ácidos graxos para o fígado em comparação com o peixe-zebra inoculado com *Proteobacteria* e Bacteroidetes (SEMOVA *et al.*, 2012).

O "metagenoma" humano é composto de genes do hospedeiro e genes presentes nos genomas dos trilhões de microrganismos que colonizam o nosso corpo. 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. Dessa forma, eliminamos a necessidade de evoluir complexos enzimáticos que seriam necessários para estas funções (TURNBAUGH *et al.*, 2006b). Nesse caso, um estudo comparativo do metagenoma fecal, a fim de compreender a complexa interação entre genética do hospedeiro, os genes da comunidade microbiana e as propriedades biológicas do "superorganismo" resultante, faz-se necessário.

Nas análises de correlação entre os metadados, alguns resultados eram esperados, como por exemplo, correlação positiva entre os dados antropométricos, correlação positiva entre insulina e HOMA-IR. Esses resultados reforçam a correta divisão dos indivíduos nos

grupos a que pertencem, além de demonstrar a importância dos dados antropométricos e laboratoriais no diagnóstico e prognóstico da obesidade.

De maneira interessante, uma correlação negativa forte e estatisticamente significativa entre os Filos Firmicutes e Bacteroidetes foi observada nos três grupos, sugerindo que o aumento de um desses filos tornaria a ambiente intestinal menos propício para o outro. Dessa forma, a simples modulação da MIH com uso probióticos e prebióticos ou até mesmo através de uma alimentação mais saudável, proporcionaria um aumento de bactérias benéficas pertencentes ao filo Bacteroidetes com uma consequente diminuição das bactérias não tão benéficas pertencentes ao filo Firmicutes, e que seriam responsáveis pelo aumento da captação energética nos indivíduos obesos.

Outros achados interessantes nas análises de correlação foram: correlação negativa forte entre os filos Bacteroidetes e Actinobactéria no grupo com sobrepeso em contraste com uma correlação positiva forte entre Firmicutes e Actinobactéria. Esses achados nos permitem inferir e destacar que o microambiente intestinal de indivíduos com sobrepeso é diferente dos indivíduos obesos, mas esse microambiente seria uma mudança inicial, sendo uma ponte para se chegar ao microambiente de uma pessoa obesa. Esses resultados reforçam a importância da não inclusão desses indivíduos no mesmo grupo de indivíduos obesos em estudos que envolvam a comparação da microbiota intestinal.

O filo Actinobacteria é composto por bactérias Gram positivas, sendo *Bifidobacterium* o gênero que pertence a esse filo mais comum no trato gastrointestinal humano. Esse grupo de bactérias estão fortemente associadas a uma manutenção da permeabilidade da barreira intestinal, sendo consideradas um grupo benéfico, porém estão associadas, também, a produção de grandes concentrações de AGCC, principalmente acetato que é captado pelo fígado onde serve como substrato para gliconeogênese, síntese de colesterol e triglicerídeos (BINDA *et al.*, 2018).

Notamos uma tendência correlação positiva entre o filo Verrucomicrobia e a variável HOMA-IR, nos grupos eutrófico e com sobrepeso que não foi vista no grupo de obesos. Essa tendência, ainda, é maior no grupo de eutróficos. O índice HOMA-IR é um método validado para medir a resistência insulínica a partir da dosagem da glicemia de jejum e insulinemia. Os resultados observados neste estudo sugerem que, em indivíduos com IMC dentro de eutróficos e sobrepeso, aqueles que apresentam maior abundância do filo Verrucomicrobia, apresentam um valor maior no índice HOMA-IR, porém ainda dentro da faixa de normalidade. Esta característica se perde no grupo de obesos.

De maneira interessante, uma correlação negativa forte e estatisticamente significativa entre os Filos Firmicutes e Bacteroidetes foi observada nos três grupos, sugerindo que o aumento de um desses filos tornaria o ambiente intestinal menos propício para o outro. Dessa forma, a simples modulação da MIH com uso probióticos e prebióticos ou até mesmo através de uma alimentação mais saudável, proporcionaria um aumento de bactérias benéficas pertencentes ao filo Bacteroidetes com uma consequente diminuição das bactérias não tão benéficas pertencentes ao filo Firmicutes, e que seriam responsáveis pelo aumento da captação energética nos indivíduos obesos.

## 6.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Claramente, estamos apenas começando a entender os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal (ou seus metabólitos) conduzem o metabolismo do hospedeiro. Isso é em parte causado pelo fato de que as técnicas necessárias para abordar estas questões também estão em desenvolvimento, incluindo a avaliação dos métodos de sequenciamento e análise computacional. Melhorias na padronização destas técnicas proporcionarão um grande passo à frente para este campo (BOUTER *et al.*, 2017). Embora a grande maioria dos estudos descrevendo a composição da microbiota intestinal em diferentes populações humanas foram realizada a partir de amostras fecais, é importante observar que microbiota fecal humana não é um reflexo do ambiente intestinal como um todo, uma vez que algumas bactérias ficam fortemente aderidas ao epitélio colônico. Isto é, obviamente, uma importante limitação que deve ser considerada na interpretação dos resultados (JIANG *et al.*, 2015)

A microbiota intestinal está sendo cada vez mais aceita como um fator que afeta o metabolismo do hospedeiro e contribui para condições patológicas, como a obesidade. No entanto, a contribuição da microbiota intestinal no processo de desenvolvimento da obesidade em humanos ainda não é claro. A etiologia da obesidade é heterogênea e, uma vez que a microbiota pode influenciar na fisiopatologia da obesidade por diferentes mecanismos, também não é de se surpreender que grupos distintos de microrganismos podem estar associados à obesidade, levando-se em conta gênero, etnia, condições genéticas e socioeconômicas do hospedeiro em que se encontra (STANISLAWSKI *et al.*, 2019). A maioria dos estudos realizados até o momento utiliza uma baixa população amostral e incluem participantes com origem étnica e hábitos alimentares diversos além de utilizarem diferentes métodos com vieses específicos, além do fato de que a MIH apresenta grande variação interpessoal. Um dos



principais desafios, até o momento, é obter biomarcadores preditivos robustos para obesidade com base na microbiota intestinal (TREMAROLI, V., & BÄCKHED, 2012).

Em estudo anterior do nosso grupo, utilizando as metodologias de FISH e PCR-DGGE que são técnicas bem padronizadas e frequentemente utilizadas em estudos de comunidades microbianas, encontramos resultados que não foram corroborados pelo estudo atual utilizando metagenômica (ROGER; MCCARTNEY, 2010). A técnica de sequenciamento de nova é considerada padrão ouro no estudo de comunidades microbianas, por ser uma técnica mais sensível e revelar dados mais finos, com maior discriminação taxonômica que nesse caso, permitiu inferir diferenças na estrutura da comunidade taxonômica por análises de distribuição e diversidade, reforçando a questão que o uso de diferentes metodologias pode implicar em diferenças nos resultados obtidos.

Um outro ponto importante no que diz respeito a discrepância de resultados entre os estudos é a não segregação de indivíduos com sobrepeso do grupo de indivíduos obesos. Em nosso estudo demonstramos que indivíduos com sobrepeso se comportam de maneira heterogenia, ora mais semelhantes aos eutróficos, ora aos obesos. Dessa forma, encaixa-los nos grupo de obesos poderia alterar os resultados.

A disparidade nos resultados dos diferentes estudos ilustra a dificuldade para definir corretamente a composição da microbiota intestinal. No entanto, esses resultados têm mostrado que a microbiota é individual e específica, portanto, as mudanças na microbiota causadas pela obesidade também tendem a ter essas características. Além disso, sua diversidade é muito grande e sua participação no processo saúde-doença do hospedeiro ainda não foram totalmente esclarecidas. (VOS; ZOETENDAL; RAJILIC, 2008).

## 7 CONCLUSÕES

- A biblioteca metagenômica construída para posterior análise de sequenciamento obteve qualidade ótima na grande maioria das amostras, apresentando apenas uma banda, apenas um *amplicon* correspondente ao número de pares de bases esperados.
- O grupo de indivíduos obesos possui menor riqueza de espécies quando comparado com indivíduos eutróficos e com sobrepeso.
- Não identificamos diferença entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes nos indivíduos dos três grupos estudados. Porém em outros grupos bacterianos encontramos diferença, demonstrando que estrutura da microbiota bacteriana intestinal tende a se diferenciar entre indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos, sendo menos semelhante entre os obesos 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 microbiota *core* de indivíduos obesos e com sobrepeso é consideravelmente menos diversa quando comparada aos indivíduos eutróficos.
- Firmicutes e Bacteroides possuem correlação negativa forte nos diferentes ambientes intestinais estudados.
- 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. et al. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. **Science translational medicine**, [S. l.], v. 6, n. 237, p. 1–22, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>. Acesso em 30 Jan, 2019.
- ADAMCZAK, M.; WIECEK, A. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **YSNEP**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 2–13, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.008>. Acesso em 21 mai. 2019.
- ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 91–109, 2012.
- ANJOS, T. et al. Gut microbiota composition is associated with body weight , weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 83–92, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114510000176>. acesso em 03 mar. 2018.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, [S. l.], v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09944>. Enterotypes. Acesso em 05 abr. 2018
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **PNAS**, [S. l.], v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004. Acesso em 25 abr. 2018
- BAHIA, L.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 13–17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12957/rhupe.2014.9793>. Acesso em 03 mar. 2018
- BALAMURUGAN, R. et al. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 335–338, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114509992182>. Acesso em 05 mar. 2018
- BENTLEY, D. R. Whole-genome re-sequencing. **Current Opinion in Genetics & Development**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 545–552, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.009>. Acesso em 24 marc. 2018.
- BERGSTRÖM, A. et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: A longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 80, n. 9, p. 2889–2900, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-14>. Acesso em 20 fev. 2018
- BIDDLE, A. et al. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. **Diversity**, [S. l.], v. 5, p. 627–640, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d5030627>. Acesso em 30 jun. 2019.
- BINDA, C. et al. Actinobacteria : A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis.

**Digestive and Liver Disease**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 421–428, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>. Acesso em 02 Dez. 2020.

BLOTTIERE, J. I D. and H. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 32, p. 195–199, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.002>. Acesso em 18 mai. 2019

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>. acesso em 21 jan. 2019.

BOUTER, K. E. *et al.* Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 152, n. 7, p. 1671–1678, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.048>. Acesso em 21 jan. 2019.

BRASIL, M. da S. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados b. **Ministério da Saúde**, [S. l.], p. 160p., 2017. Disponível em: <https://doi.org/ISBN978-85-334-2479-1>. Acesso em 10 out. 2020.

BREHM, B. J. and; D’ALESSIO, D. A. Environmental Factors Influencing Obesity. *In*: MDTEXT.COM, E. [Internet]. S. D. (MA): (org.). **NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health**. [S. l.: s. n.]. p. 1–10. *E-book*.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. **Probiotics and Prebiotics in Human Health : An Overview**. First edit ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2010. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00006-2>. Acesso em 03 mar. 2018.

CANCELLO, R.; CLE, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **An international journal of obstetrics and gynaecology**, [S. l.], v. 01, n. 04, p. 1141–1147, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x>. Acesso em 25 mar. 2018

CANI, P. *et al.* The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Diabetologia: clinical and experimental diabetes and metabolism** [S. l.], v. 33 n. 1, p. 94 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>. Acesso em 3 jul. 2018.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **American Diabetes Association**, [S. l.], v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db06-1491.P.D.C>. Acesso em 02 mar. 2018.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.QIIME>. Acesso em 05 nov. 2018.

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 Development of a dietary assessment method for people of Japanese descent living in

São Paulo , Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 107–114, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2000000100011>. Acesso em 05 dez 2017.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of statistics**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHATEL, J. M. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 255–261, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.003>. Acesso em 05 nov. 2018.

CLEMENTE, J. C. *et al.* Review The Impact of the Gut Microbiota on Human Health : An Integrative View. **Cell**, [S. l.], v. 148, n. 6, p. 1258–1270, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.03>. Acesso em 06 nov. 2018.

COHEN-COLE, E.; FLETCHER, J. M. Is Obesity Contagious? Social Networks vs. Environmental Factors in the Obesity Epidemic. **Int J Obes Relat Metab Disord**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 721–729, 1992.

COLLADO, M. C. *et al.* Intestinal Integrity and Akkermansia muciniphila , a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants , Adults , and the Elderly . **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 73, n. 23, p. 7767–7770, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01477-07>. Acesso em 08 mai. 2018.

COLLADO, M. C. *et al.* Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Nature Publishing Group**, [S. l.], n. February, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep23129>. Acesso em 03 mai. 2018.

DAVE, M. *et al.* The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, [S. l.], v. 160, n. 4, p. 246–257, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.003>. Acesso em 05 ago. 2018.

DERRIEN, M. *et al.* Modulation of mucosal immune response , tolerance , and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader Akkermansia muciniphila. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 2, n. August, p. 1–14, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166>. Acesso em 06 jan. 2019,

DETHLEFSEN, L. *et al.* The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota , as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. **Plos Biology**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 2383–2400, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>. Acesso em 3 mai. 2018.

DE PAULA, Thaís Oliveira. **Diversidade bacteriana intestinal e parâmetros nutricionais de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutóficos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

DILLON, S. M. *et al.* Gut dendritic cell activation links an altered colonic microbiome to mucosal and systemic T-cell activation in untreated HIV-1 infection. **Mucosal Immunology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 24–37, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mi.2015.33>. Acesso

em 20 maio. 2018.

DUNCAN, S. H. *et al.* Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 4, p. 1073–1078, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02340-06>. acesso em 08 jun. 2019.

DUNCAN, S. H. *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 1720–1724, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155>. Acesso em 23 set. 2019

EARLEY, Z. M. *et al.* Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129996>. Acesso em 02 dez. 2020.

ECKBURG, P. B. *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, [S. l.], v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2006.

EREN, A. M. *et al.* A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity. **International Society for Microbial Ecology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 90–100, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.97>. Acesso em 26 nov. 2017.

EVERARD, A.; SC, M.; CANI, P. D. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Diabetes , obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 73–83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.007>. Acesso em 18 jan. 2018

FEDURCO, M. *et al.* BTA , a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 1–13, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>. Acesso em 19 jan. 2019.

FERNANDES, J. *et al.* Adiposity , gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. **Nutrition & Diabetes**, [S. l.], v. 4, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nutd.2014.23>. Acesso em 25 jun. 2018.

FILIPPO, C. De *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **PNAS**, [S. l.], v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>. Acesso em 13 fev. 2019.

FONTAINE, K. R.; BAROFSKY, I. Obesity and healthy-related quality of life .**Obesity Reviews**. [S. l.], v. 2, n. 1, p. 173–182, 2001.

FRONT, V. D. D. Saint *et al.* Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International Journal of Obesity**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 1187–1195, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802407>. Acesso em 18 fev. 2018.

FUJIO-VEJAR, S. *et al.* The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 8, n.1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01221>. Acesso em 03 set.

2019.

FURET, J. *et al.* Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss. **Diabetes**, [S. l.], v. 59, n. 12, p. 3049–3057, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db10-0253>. Acesso em 08 abr. 2018.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 141–143, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2005.081695>. Acesso em 05 abr. 2018.

FURUHASHI, M., TUNCMAN, G., GÖRGÜN, C. Z., MAKOWSKI, L., ATSUMI, G., VAILLANCOURT, E. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Nature**, [S. l.], v. 447, n. 7147, p. 959–965, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05844.Treatment>. Acesso em 20 abr. 2018.

GALLO, C.; SILVA, G.; CRISTINA, D. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.

GELONEZE, B. *et al.* HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 281–287, 2009.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D.; BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater : Understanding microbial communities , detecting pathogens , and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 1–20, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.016>. Acesso em 25 abr. 2018

GOSALBES, M. J.; LLOP, S.; VALL, Y. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants Experimental Allergy. **Clinical and Experimental Allergy** [S. l.], v. 43, n.1, p. 198–211, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cea.12063>. Acesso em 27 jan. 2019.

HANDELSMAN, J.; HANDELSMAN, J. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MBR.68.4.669>. Acesso em 21 fev. 2018.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, [S. l.], v. 5, p. 245–249, 1998. Acesso em 15 jan. 2020.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota : mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1756283X12459294>. Acesso em 18 jan. 2020.

HILL, J. O.; PETERS, J. C. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. **Science**, [S. l.], v. 280, n. 5368, p. 1371–1374, 1998.

- HMP. Structure , function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, [S. l.], v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11234>. Acesso em 19 ago. 2019.
- HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptides Neuropeptide Y , peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut – brain axis. **Neuropeptides**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 261–274, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.08.005>. Acesso em 18 out. 2019.
- HOODLESS, R. C. O. A. P. A. The next generation : Using new sequencing technologies to analyse gene regulation. **Respirology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 210–222, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01899.x>. Acesso em 15 jane. 2020.
- HOOPER, L. V; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annu. Rev. Nut.**, [S. l.], v. 22, p. 283–307, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>. Acesso em 19 jan. 2020.
- HWANG, D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through Toll-like receptor 4-derived signaling pathways 1. **The FASEB journal** [S. l.], v. 15, n.14, p. 2556-2564, 2001.
- JIANG, W. *et al.* Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. **scientifics reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep08096>. Acesso em 17 nov. 2019.
- JIMONEZ, E. *et al.* Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. **Currente Microbiology** [S. l.], v. 51 n.1, p. 270-274, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>. Acesso em 25 nov. 2018
- JOHNSON, E. L. *et al.* Microbiome and metabolic disease : revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. **Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1492->. Acesso em 23 jan.2019.
- KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. **Endocrine reviews**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 439–451, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2005-0005>. Acesso em 05 dez. 2018.
- KAJI, I.; KARAKI, S. Short-Chain Fatty Acid Receptor and Its Contribution to Glucagon-Like Peptide-1. **Digestion**, [S. l.], v. 89, p. 31–36, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000356211>. Acesso em 28 jun. 2018.
- KEYLOCK, C. J.; LANE, W. Simpson diversity and the Shannon Wiener index as special cases of a generalized entropy /. **Oikos**, [S. l.], v. 109, n. 5, p. 203–207, 2005.
- KLEIN, S. *et al.* Waist Circumference and Cardiometabolic Risk : A Consensus Statement from Shaping America ’ s Health : Association for Weight Management and Obesity



Prevention ; NAASO , The Obesity Society ; the American Society for Nutrition ; and the American Diabetes. **Obesity**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1061–1067, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/oby.2007.632>. Acesso em 03 mar. 2019.

KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>. Acesso em 06 fev. 2020.

KOLA, B.; HARVEY, W. Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Control of Appetite Neuroendocrinology. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 20, n. 13, p. 942–951, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01745.x>. acesso em 09 fev. 2020.

KOLIADA, A. *et al.* Association between body mass index and Firmicutes / Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 4–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>. Acessom em 24 mar. 2018.

LAGHI, A. What's Behind the Obesity Epidemic ? *In*: SPRINGER (org.). **Imaging in Bariatric Surgery**. [S. l.: s. n.]. p. 1–5. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49299-5>. Acesso em 24 nov. 2017.

LARSEN, N. *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. e9085, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085> Acesso em 15 jul. 2018.

LAURA, M. *et al.* Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saúde pública**, [S. l.], v. 49, n. 38, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006132>. Acesso em 25 abr. 2019.

LEY, R. *et al.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7122, p. 1022–3, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature4441021a>. Acesso em 30 abr. 2018.

LEY, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>. acesso em 03 set. 2017.

LEY, R. E. Prevotella in the gut : choose carefully. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 69–70, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.4>. Acesso em 08 out.2018

LÓPEZ-CEPERO, A. A.; PALACIOS, C. Association of the Intestinal Microbiota and Obesity. **PRHSJ**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 60–64, 2015.

LORENZO, M.; FERNA, S. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-  $\alpha$  in myocytes and brown adipocytes 1 , 2. **Journal of Animal Science**, [S. l.], v. 6, n. June, p. 94–104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0462>. Acesso em 23 mar.2020.

MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. Mechanisms underlying the

resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **PNAS**, [S. l.], v. 104, n. 3, 2007.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>. Acesso em 24 fev. 2018.

MATAMOROS, S. *et al.* Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 167–173, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.12.001>. Acesso em 09 jan. 2018;

MCORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A. R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 131–139, 2002.

MELO, A. S. O que ganhamos confundindo riqueza e equabilidade - Melo 2008.pdf. **Biota Neotropica**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 21–27, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000300001>. Acesso em 24 fev. 2018.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 31–46, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg2626>. Acesso em 25 fev. 2018.

MONTEIRO, L. *et al.* Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces : Helicobacter pylori Model. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 995–998, 1997.

MONTEIRO, L. *et al.* Detection of Helicobacter pylori in human feces by PCR : DNA stability and removal of inhibitors Detection of Helicobacter pylori DNA in human feces by PCR : DNA stability and removal of inhibitors. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 45, p. 89–94, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00225-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00225-1). Acesso em 30 abr. 2020.

MOREIRA, A. P. B.; TEIXEIRA, T. F. S.; GOUVEIAPELUZIO, M. C. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutricion hospitalaria**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1408–1414, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.5.5887>. Acesso em 23 nov. 2017.

NICHOLSON, J. K. *et al.* Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. **SCIENCE** [S. l.], v. 336, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1223813>. Acesso em 08 jun. 2020.

PATTI, M.; KAHN, C. R. THE INSULIN RECEPTOR - A CRITICAL LINK IN GLUCOSE HOMEOSTASIS AND INSULIN ACTION. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 2–4, p. 89–110, 1998.

PNG, C. W. *et al.* Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. **The American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 105, n. 11, p. 2420–2428, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>. Acesso em 23 jan. 2019.

PORETSKY, R. *et al.* Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 4, p.

e93827, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>. Acesso em 06 jun. 2020.

POULAIN-GODEFROY, O. *et al.* Inflammatory Role of Toll-Like Receptors in Human and Murine Adipose Tissue. **Mediators of Inflammation** [S. l.], v. 2010, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/823486>. Acesso 05 jul 2018.

PRENTICE, A. M. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 93–99, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ije/dyi272>. |Acesso em 28 jun. 2020

PYLRO, V. S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 107, p. 30–37, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.018>. Acesso em 03 marc. 2017.

QI, Q. *et al.* Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers , insulin resistance , and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. **European Journal of Endocrinology** [S. l.], v. 159, p. 585-593, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0427>. Acesso em 27 abr. 2018.

QIN, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. [S. l.], v. 464, p. 59-65, 2010 . Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08821>. Acesso em 24 maio. 2019.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 71, p. 635–700, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>. Acesso em 28 ago. 2020.

ROGER, L. C.; MCCARTNEY, A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. **Microbiology** [S. l.], v. 156, p. 3317–3328, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.041913-0>. Acesso em 10 Nov. 2020.

ROGNES, T. *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, [S. l.], v. 4, p. e2584, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>. Acesso em 13 out. 2017.

SANSCHAGRIN, S.; YERGEAU, E. Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 90, p. 3–8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/51709>. Acesso em 23 set. 2017.

SCHENK, S. *et al.* Insulin sensitivity : modulation by nutrients and inflammation Find the latest version : Personal perspective Insulin sensitivity : modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest** [S. l.], v. 118, n. 9, p. 2992–3002, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI34260.2992>. Acesso em 04 maio. 2019.

SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 35–38, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1136/gut.35.1\\_suppl.s35](https://doi.org/10.1136/gut.35.1_suppl.s35). Acesso em 29 abr. 2018.

SCHER, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, [S. l.], v. 2, p. 1–20, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>. Acesso em 03 mar. 2020.

SCHO, J.; SALZBERGER, B. Adipose tissue as an immunological organ : Toll-like receptors, C1q / TNFs and CTRPs **Trends in Immunology**. [S. l.], v. 28, n. 9, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.003>. Acesso em 30 mai.2020.

SCHUSTER, D. P. Obesity and the development of type 2 diabetes : the effects of fatty tissue inflammation. **Diabetes Metab Syndr Obes** [S. l.], v. 3, p. 253–262, 2010. Acesso em 29 abr. 2018.

SCHWIERTZ, A. *et al.* Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 190–195, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>, Acesso em 20 abr. 2018.

SEKIROV, I. *et al.* Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews** [S. l.], v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>. Acesso em 29 jun. 2017.

SEMOVA, I. *et al.* Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish. **Cell Host and Microbe**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 277–288, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>. 15 jan. 2020.

SHADE, A.; HANDELSMAN, J. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 4–12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>. Acesso em 29 out. 2018.

STANISLAWSKI, M. A. *et al.* Gut microbiota phenotypes of obesity. **npj Biofilms and Microbiomes**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0091-8>. Acesso em 12 Nov. 2020.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages : their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology** [S. l.], v. 88, p. 33–39, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.0210072>. Acesso em 21 abr. 2018.

SUN, K. *et al.* Adipose tissue remodeling and obesity Find the latest version : Review series Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI45887.2094>. 15 jan. 2020.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 160–168, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.09.002>. Acesso em 07 jun. 2019

TANNOCK, G. W. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. **European Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 44–49, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601661>. Acesso em 20 abr. 2018.

TAP, J. *et al.* Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology** [*S. l.*], v. 11, n. 10, p. 2574–2584, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>. Acesso em 18 Out. 2018.

TILG, H. *et al.* Gut microbiome , obesity , and metabolic dysfunction Find the latest version : Review series Gut microbiome , obesity , and metabolic dysfunction. **the journal of the clinical investigation**, [*S. l.*], v. 121, n. 6, p. 2126–2132, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI58109.2126>. Acesso em 14 nov. 2018.

TREMAROLI, V., & BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, [*S. l.*], v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11552>. Acesso em 04 dez. 2017.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [*S. l.*], v. 444, n. 1, p. 1027–1031, 2006 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05414>. Acesso em 09 dez. 2017.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [*S. l.*], v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05414>. 15 jan. 2020.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, [*S. l.*], v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07540>

ULVEN, T.; SMITH, N. J.; CHANG, V. Short-chain free fatty acid receptors FFA2 / GPR43 and FFA3 / GPR41 as new potential therapeutic targets. **Frontiers in Endocrinology**, [*S. l.*], v. 3, n. October, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00111>. Acesso em 04 dez. 2017.

VERDAM, F. J. *et al.* Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity**, [*S. l.*], v. 21, n. 12, p. 607–615, 2013. Acesso em 20 dez. 2017.

VOS, W. M. De; ZOETENDAL, E. G.; RAJILIC, M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, [*S. l.*], v. 57, p. 1605–1615, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2007.133603>. Acesso em 25 jan. 2018.

WALTER, J.; LEY, R. The Human Gut Microbiome : Ecology and Recent Evolutionary Changes. **Annual Reviews of Microbiology**, [*S. l.*], v. 65, p. 411–429, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102830>. Acesso em 03 out. 2017.

WANG, B. *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, [*S. l.*], v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>. Acesso em 15 dez. 2017.

WARD, D. M., WELLER, R., & BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, [*S. l.*], v. 345, n. 6270, p. 63–65, 1990. Acesso em 21 fev. 2018.

- WITHROW, D.; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. **Obesity Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 131–141, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00712.x>. Acesso em 08 mar. 2018.
- WOLEVER, T. M. S., SPADAFORA, P., & ESHUIS, H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 681–687, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.3.681>. Acesso em 23 ago. 2019.
- WOODMANSEY, E. J. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 102, p. 1178–1186, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x>. Acesso em 28 dez 2018.
- WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A Primer on Metagenomics. **Plos computational microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 1–13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>, 15 jan. 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation**. [S. l.]: World Health Organization, 2000. *E-book*. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=AvnqOsqv9doC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Obesity:+preventing+and+managing+the+global+epidemic.+Report+of+a+WHO+consultation+on+obesity&ots=6UM07q\\_V3H&sig=jyNnAHJ7ijXp\\_jbViNdzyPI0ID8#v=onepage&q=Obesity%3A+preventing+and+managing+the+global+epidemic.+Report+of+a+WHO+consultation+on+obesity&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=AvnqOsqv9doC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Obesity:+preventing+and+managing+the+global+epidemic.+Report+of+a+WHO+consultation+on+obesity&ots=6UM07q_V3H&sig=jyNnAHJ7ijXp_jbViNdzyPI0ID8#v=onepage&q=Obesity%3A+preventing+and+managing+the+global+epidemic.+Report+of+a+WHO+consultation+on+obesity&f=false). Acesso em: 24 mar. 2017.
- WOTING, A.; BLAUT, M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. **nutrients**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 114–116, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu8040202>. Acesso em 21 mai. 2020.
- YILMAZ, P. *et al.* The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 42, n. D1, p. 643–648, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>. 19 jan. 2020.
- ZHANG, C. *et al.* Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 1848–1857, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.27>. Acesso em 30 jan. 2020.
- ZHANG, H. *et al.* Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 7, p. 2365– 2370., 2008.
- ZHU, L. *et al.* Characterization of Gut Microbiomes in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Patients: A Connection Between Endogenous Alcohol and NASH. **Hepatology**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 601–609, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hep.26093> Acesso em 25 jul. 2019.
- ZHU, S. *et al.* Waist circumference and obesity-associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey : clinical action thresholds 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 76, n. 4, p. 743–9, 2002. 16 jan. 2018.

**APÊNDICE A – Dados nutricionais dos indivíduos estudados.**

Tabela 6: dados nutricionais dos indivíduos estudados.

<b>Número</b>	<b>Grupo</b>	<b>Kcal</b>	<b>Carb.</b>	<b>PTN</b>	<b>LIP</b>	<b>FIB</b>
102	Eutrófico	2392,36	47,11	12,09	32,18	14,75
105	Eutrófico	1808,41	73,93	19,47	26,54	26,45
106	Eutrófico	2683,64	66,32	14,81	22,93	56,7
107	Eutrófico	4231,67	69,85	18,67	29,26	48,35
109	Eutrófico	2013,29	56,85	21,91	32,12	23,02
110	Eutrófico	1720,53	37,38	22,6	38,25	13,91
111	Eutrófico	1799,29	51,91	21,77	24,73	21,53
112	Eutrófico	1637,6	58,89	24,03	35,76	11,47
114	Eutrófico	2099,58	63,19	20,66	26,33	48,59
116	Eutrófico	1834,76	56,96	17,25	27,76	11,6
117	Eutrófico	1784,06	31,43	18,08	65,97	24,89
119	Eutrófico	982,08	60,16	30,83	39,49	6,4
120	Eutrófico	2317,65	46,52	15,83	40,67	27,34
121	Eutrófico	1599,62	52,41	18,06	31,7	27,38
122	Eutrófico	1592,79	61,62	14,17	27,67	22,22
124	Eutrófico	2648,29	58,15	13,72	28,18	33,56
125	Eutrófico	2201,29	48,7	18,77	32,27	22,18
126	Eutrófico	1419,45	35,07	17,84	51,94	16,52
127	Eutrófico	1246,04	56,45	17,04	31,66	8,15
128	Eutrófico	1249,8	54,4	18,11	28,4	15,84
129	Eutrófico	2011,68	53,9	15,86	32,57	25,57
130	Eutrófico	1510,44	50,12	20,66	29,87	14,39
2	Sobrepeso	2461,07	67,05	16,42	24,48	28,06
9	Sobrepeso	2383,36	57,8	12,31	19,61	25,27
21	Sobrepeso	1788,24	60,16	15,94	24,7	21,84
22	Sobrepeso	2328,45	60,11	16,22	36,59	23,86
28	Sobrepeso	3277,4	54,22	19,49	31,89	25,32
29	Sobrepeso	1966,58	56,57	18,13	26,5	25,91
30	Sobrepeso	2176,6	52,12	18,19	29,96	34,6
35	Sobrepeso	1186,13	47	26,11	31,09	20,12

38	Sobrepeso	2254,64	48,62	21,3	31,62	30,43
41	Sobrepeso	991,82	53,25	22,21	27	13,23
42	Sobrepeso	876,01	51,67	22,89	24,32	7,99
44	Sobrepeso	4759,7	55,69	11,91	33,78	63,7
108	Sobrepeso	2892,46	39,59	18,59	42,05	33,81
113	Sobrepeso	1811,45	50,2	18,68	30,88	23,51
203	Sobrepeso	1430,07	48,65	20,84	38,51	10,99
205	Sobrepeso	1998,68	45,34	19,29	34,58	21,78
206	Sobrepeso	1535,51	62,93	16,98	38,03	14,56
207	Sobrepeso	1437,91	58,86	17,02	27,09	11,55
208	Sobrepeso	2030,87	63,75	17,52	23,95	47,03
209	Sobrepeso	1449,08	62,7	23,84	35,09	20,08
210	Sobrepeso	1024,49	70,69	19,82	21,28	15,21
211	Sobrepeso	2491,95	54,55	15,46	30,23	40,49
212	Sobrepeso	2460,28	71,92	15,65	28,09	31,57
1	Obeso	2670,9	54	15,68	35,09	31,16
4	Obeso	973,02	49,29	20,66	31,67	17,78
6	Obeso	2065,47	56,84	25,26	27,9	43,03
7	Obeso	4504,78	48,32	14,91	36,95	42,77
10	Obeso	2377,52	46,92	23,51	32,32	40,61
11	Obeso	1517,24	53,82	15,72	31,43	26,82
14	Obeso	1500,33	66,35	14,32	28,13	23,29
15	Obeso	1986,92	55,88	17,91	26,74	40,67
17	Obeso	1707,39	49,3	13,08	38,44	14,23
24	Obeso	1394,31	48,48	17,47	34,98	13
27	Obeso	2708,38	42,47	19,69	35,11	31,43
32	Obeso	2467,46	64,75	18,35	16,12	33,8
34	Obeso	5388,86	68,74	14,64	24,11	52
39	Obeso	2009,64	56,91	24,22	20,38	26,97
45	Obeso	3073,26	51,32	14,67	31,72	49,37
46	Obeso	1339,59	54,15	23,7	31,46	16,14
54	Obeso	1890,7	62,77	24,72	26,26	32,02
55	Obeso	2157,41	53,34	16,92	30	22,59



---

57	Obeso	1569,87	70,74	21,47	17,24	27,35
59	Obeso	1079,04	74,5	21,47	20,01	18,56
60	Obeso	1736,53	68,25	17,47	25,75	27,37

---

Fonte: elaborada pelo autor. Kcal =calorias ingeridas; Carb.= carboidratos; PTN= proteínas; LIP= lipídeos; FIB= fibras.

**APÊNDICE B –Dados antropométricos dos indivíduos estudados.**

Tabela 7: dados antropométricos dos indivíduos estudados

<b>Número</b>	<b>Grupo</b>	<b>BMI</b>	<b>WC</b>	<b>AC</b>	<b>HC</b>	<b>WC/AC</b>
102	Eutrófico	23,61	72,00	78,0	101,00	0,71
105	Eutrófico	22,25	75,00	83,0	98,00	0,76
106	Eutrófico	22,36	76,00	85,0	99,00	0,76
107	Eutrófico	21,75	74,00	79,0	102,00	0,72
109	Eutrófico	20,16	70,00	77,0	92,00	0,76
110	Eutrófico	21,75	78,00	79,0	93,00	0,83
111	Eutrófico	22,85	78,00	84,0	101,00	0,75
112	Eutrófico	24,00	81,00	90,5	111,00	0,72
114	Eutrófico	24,85	78,00	87,0	104,00	0,75
116	Eutrófico	22,29	74,50	88,0	102,00	0,73
117	Eutrófico	24,27	71,00	79,0	100,00	0,71
119	Eutrófico	20,16	73,00	81,0	99,00	0,74
120	Eutrófico	23,46	70,00	75,0	99,00	0,71
121	Eutrófico	23,90	81,00	88,0	97,00	0,84
122	Eutrófico	23,81	85,00	88,0	102,00	0,83
124	Eutrófico	24,60	89,00	96,0	103,00	0,86
125	Eutrófico	21,09	71,00	81,0	93,00	0,76
126	Eutrófico	24,50	102,00	102,0	99,00	1,03
127	Eutrófico	24,49	94,00	99,0	103,00	0,91
128	Eutrófico	24,96	92,00	95,0	100,00	0,92
129	Eutrófico	18,55	71,00	77,0	93,00	0,76
130	Eutrófico	20,68	69,00	72,0	90,00	0,76
2	Sobrepeso	27,70	78,50	88,0	106,00	0,74
9	Sobrepeso	29,33	90,00	106,0	117,00	0,76
21	Sobrepeso	26,17	90,00	96,0	104,00	0,86
22	Sobrepeso	26,42	96,00	101,0	102,00	0,94
28	Sobrepeso	26,64	88,00	97,0	107,00	0,82
29	Sobrepeso	95,50	95,50	98,0	108,00	0,88
30	Sobrepeso	25,13	77,50	83,0	100,00	0,77
35	Sobrepeso	26,78	82,00	91,0	108,00	0,76
38	Sobrepeso	28,94	87,50	96,5	109,00	0,80
41	Sobrepeso	29,06	88,00	98,0	103,00	0,85
42	Sobrepeso	26,16	94,00	93,5	104,00	0,90
44	Sobrepeso	27,66	90,50	92,0	107,00	0,84
108	Sobrepeso	26,15	86,00	92,0	100,00	0,86
113	Sobrepeso	25,60	82,00	86,0	102,00	0,80
203	Sobrepeso	26,43	83,50	95,0	111,00	0,75
205	Sobrepeso	28,85	89,00	92,0	104,00	0,86
206	Sobrepeso	26,25	85,00	90,0	102,00	0,83
207	Sobrepeso	25,17	93,00	97,0	101,00	0,92
208	Sobrepeso	26,92	85,00	95,0	102,00	0,83

209	Sobrepeso	28,63	95,00	98,0	105,00	0,90
210	Sobrepeso	26,03	95,00	99,0	106,00	0,90
211	Sobrepeso	25,30	91,00	95,0	114,00	0,80
212	Sobrepeso	26,19	94,00	95,0	104,00	0,90
1	Obeso	30,92	97,00	100,0	106,00	0,91
4	Obeso	43,18	113,00	115,0	134,00	0,84
6	Obeso	44,87	120,00	119,0	136,00	0,88
7	Obeso	30,38	89,00	104,0	110,00	0,80
10	Obeso	42,38	139,00	142,0	143,00	0,97
11	Obeso	41,67	113,00	130,0	127,00	0,88
14	Obeso	30,13	91,00	95,0	109,00	0,83
15	Obeso	40,59	115,00	119,0	120,00	0,95
17	Obeso	35,12	106,00	105,0	112,00	0,95
24	Obeso	32,52	110,00	105,0	112,00	0,98
27	Obeso	40,12	96,00	114,0	121,00	0,79
32	Obeso	50,05	147,00	147,0	145,00	1,01
34	Obeso	31,64	99,00	101,0	11,00	0,89
39	Obeso	37,10	116,00	115,0	120,00	0,96
45	Obeso	50,30	150,00	150,0	112,00	1,34
46	Obeso	37,22	109,00	121,0	131,00	0,83
54	Obeso	31,69	105,00	105,0	113,00	0,93
55	Obeso	32,32	121,00	119,0	105,00	1,15
57	Obeso	30,13	99,00	100,0	102,00	0,97
59	Obeso	35,28	123,00	124,0	113,00	1,09
60	Obeso	32,31	107,00	107,0	110,00	0,97

Fonte: elaborada pelo autor. BMI= índice de massa corporal, WC= circunferência da cintura, AC= circunferência abdominal; HC= Circunferência do quadril.

**APÊNDICE C - Dados laboratoriais dos indivíduo estudados.**

Tabela 8: dados laboratoriais dos indivíduo estudados.

Número	Grupo	Glyc	TAG	Chol	LDL	HDL	Creatine	Cortisol	Insulina	HOMA-		Hb
										IR	HOMA-β	
102	Eutrófico	75	49,00	168,00	88,00	71,00	1,03	23,60	3,60	0,70	108,70	13,30
105	Eutrófico	77	53,00	165,00	97,00	58,00	0,87	11,57	4,60	1,80	454,00	12,30
106	Eutrófico	91	181,00	181,00	115,00	42,00	1,00	17,60	7,60	1,70	98,00	13,10
107	Eutrófico	87	136,00	150,00	100,00	45,00	0,98	15,00	6,30	1,20	96,00	13,50
109	Eutrófico	83	85,00	194,00	122,00	55,00	0,92	13,35	2,40	0,50	43,40	13,00
110	Eutrófico	87	112,00	162,00	97,00	43,00	0,99	18,18	2,80	0,60	42,20	12,00
111	Eutrófico	81	44,00	169,00	93,00	68,00	0,99	17,23	3,20	0,60	64,30	15,10
112	Eutrófico	83	187,00	269,00	151,60	80,00	1,10	17,10	7,40	1,50	133,80	13,30
114	Eutrófico	94	208,00	188,00	96,00	51,00	0,85	24,86	10,00	2,30	116,50	11,00
116	Eutrófico	79	60,00	150,00	88,00	50,00	1,00	23,60	3,60	0,70	108,70	13,30
117	Eutrófico	84	86,00	188,00	100,00	71,00	1,13	15,82	4,80	1,00	82,60	12,60
119	Eutrófico	78	122,00	218,00	136,00	58,00	0,73	12,80	4,70	0,90	113,40	13,50
120	Eutrófico	84	66,00	252,00	179,00	60,00	0,95	13,80	4,50	1,20	112,00	13,40
121	Eutrófico	94	208,00	188,00	96,00	51,00	0,85	24,86	10,00	2,30	116,50	11,00
122	Eutrófico	99	104,00	209,00	114,00	75,00	0,88	11,30	6,50	1,60	65,20	14,40
124	Eutrófico	79	109,00	183,00	120,20	41,00	1,13	4,50	3,80	0,70	85,90	15,30
125	Eutrófico	84	91,00	218,00	141,00	59,00	0,87	13,48	5,30	1,10	91,20	15,00
126	Eutrófico	115	198,00	191,00	112,00	40,00	0,96	6,05	5,20	1,50	36,10	16,80
127	Eutrófico	78	124,00	213,00	147,00	42,00	1,04	8,06	7,00	1,30	168,90	13,70
128	Eutrófico	98	57,00	179,00	113,00	55,00	1,04	14,96	5,70	1,40	58,80	14,50
129	Eutrófico	77	38,00	122,00	64,00	51,00	1,20	15,30	3,10	0,60	80,20	14,30
130	Eutrófico	81	103,00	208,00	126,46	61,00	1,12	11,30	11,30	2,30	120,00	12,90
2	Sobrepeso	80	146,00	182,00	105,00	48,00	0,98	28,20	6,30	1,90	129,90	12,30
9	Sobrepeso	82	70,00	144,00	72,00	58,00	0,86	13,25	6,40	1,30	121,80	12,80

21	Sobrepeso	88	50,00	193,00	137,00	46,00	0,92	2,40	14,10	3,10	203,80	13,50
22	Sobrepeso	95	176,00	174,00	107,00	32,00	1,01	8,42	8,00	1,90	90,30	16,00
28	Sobrepeso	89	109,00	216,00	127,00	68,00	0,75	5,20	9,40	2,10	130,60	13,60
29	Sobrepeso	97	138,00	195,00	131,00	37,00	1,07	8,00	11,30	2,70	120,00	15,30
30	Sobrepeso	88	147,00	137,00	50,00	58,00	0,83	22,30	13,00	2,80	187,90	13,50
35	Sobrepeso	81	80,00	138,00	73,00	49,00	1,20	14,20	8,00	1,60	160,70	15,80
38	Sobrepeso	83	101,00	183,00	105,00	58,00	0,87	12,60	9,30	1,90	168,10	13,00
41	Sobrepeso	108	103,00	242,00	166,00	56,00	0,70	14,70	6,60	1,80	52,90	14,40
42	Sobrepeso	108	114,00	168,00	96,00	50,00	1,11	16,00	4,20	1,10	33,70	14,40
44	Sobrepeso	93	60,00	151,00	91,00	49,00	0,78	10,00	5,00	1,50	115,60	13,00
108	Sobrepeso	95	144,00	264,00	193,00	43,00	1,10	12,35	9,40	2,20	106,10	15,50
113	Sobrepeso	75	40,00	117,00	65,00	44,00	1,13	13,27	5,50	1,00	166,00	14,30
203	Sobrepeso	84	142,00	223,00	142,00	53,00	0,80	20,53	16,50	3,40	284,00	12,40
205	Sobrepeso	93	57,00	151,00	91,00	49,00	0,78	8,46	9,60	2,20	115,60	12,20
206	Sobrepeso	78	89,00	204,00	106,00	81,00	0,73	18,21	10,30	2,00	248,50	13,20
207	Sobrepeso	99	235,00	251,00	166,00	38,00	1,14	10,03	5,90	1,40	59,20	15,30
208	Sobrepeso	80	29,00	182,00	128,00	49,00	0,88	9,60	4,40	0,90	93,60	14,00
209	Sobrepeso	93	181,00	184,00	112,00	36,00	1,26	13,40	15,40	3,50	185,40	15,80
210	Sobrepeso	89	50,00	194,00	129,00	55,00	0,76	5,56	6,50	1,40	90,30	13,00
211	Sobrepeso	87	54,00	163,00	97,00	56,00	1,02	12,77	9,10	2,00	137,00	15,50
212	Sobrepeso	105	169,00	241,00	165,00	43,00	0,94	12,18	4,50	1,20	38,70	15,00
1	Obeso	114	681,00	274,00	#NULO!	56,00	1,29	7,80	12,40	2,90	161,20	12,70
4	Obeso	104	109,00	186,00	125,00	40,00	1,07	5,67	9,80	2,50	86,30	13,90
6	Obeso	68	41,00	118,00	66,00	44,00	0,64	9,18	6,30	1,10	459,90	11,80
7	Obeso	127	232,00	221,00	119,00	56,00	0,94	14,10	7,60	2,40	42,80	13,50
10	Obeso	71	77,00	181,00	119,00	47,00	0,83	4,60	10,00	1,80	454,00	11,90
11	Obeso	61	66,00	160,00	112,00	35,00	0,81	8,19	41,10	6,20	160,10	13,60
14	Obeso	85	136,00	142,00	70,00	45,00	0,99	17,10	5,20	1,10	85,40	16,60
15	Obeso	100	274,00	272,00	158,00	60,00	1,26	16,60	17,30	4,30	168,80	14,00
17	Obeso	95	144,00	264,00	193,00	43,00	1,10	12,35	9,40	2,20	106,10	15,50

24	Obeso	98	82,00	159,00	106,00	37,00	1,30	10,20	10,10	3,10	159,90	15,10
27	Obeso	83	161,00	194,00	114,00	48,00	0,99	9,70	6,30	1,30	113,90	13,20
32	Obeso	137	182,00	161,00	91,00	34,00	0,72	10,60	19,30	6,80	88,10	13,80
34	Obeso	88	226,00	214,00	122,00	47,00	1,19	5,20	6,60	1,40	95,40	15,20
39	Obeso	110	137,00	262,00	175,00	60,00	0,96	7,60	4,00	1,10	30,70	12,90
45	Obeso	82	121,00	152,00	87,00	41,00	1,09	9,84	12,70	2,60	241,70	13,90
46	Obeso	95	144,00	264,00	193,00	43,00	1,10	12,35	9,40	2,20	106,10	15,50
54	Obeso	77	85,00	152,00	88,00	47,00	0,88	11,36	15,10	2,90	390,40	12,90
55	Obeso	103	157,00	172,00	109,00	32,00	1,01	10,85	15,10	3,80	136,30	15,00
57	Obeso	84	136,00	220,00	135,00	58,00	0,74	11,81	10,40	2,20	179,00	12,30
59	Obeso	125	200,00	215,00	134,00	41,00	0,88	11,90	14,60	4,50	84,90	14,40
60	Obeso	114	130,00	179,00	126,00	27,00	1,04	8,30	35,00	9,80	247,70	15,40

Fonte: elaborada pelo autor: Gly= glicose; TAG= triglicérides; Chol= colesterol; LDL=colesterol LDL; HDL= colesterol HDL; Hb= hemoglobina

**APÊNDICE D – Número de *Reads* por amostra**

Tabela 9: Número de *Reads* por amostra

Amostra	Número de <i>Reads</i>
32	8427.0
29	8512.0
207	8560.0
203	9931.0
44	10771.0
107	11599.0
108	11619.0
129	12342.0
113	13581.0
42	13734.0
35	14241.0
208	14307.0
205	15120.0
119	16352.0
46	16858.0
7	17267.0
28	17462.0
210	17635.0
114	17888.0
127	18427.0
9	19187.0
41	19287.0
59	19494.0
39	20790.0
212	21681.0
130	23097.0
30	23199.0
22	24065.0
15	24663.0
4	25333.0
106	27509.0
6	28940.0
45	29132.0
126	30118.0
60	30271.0
24	30353.0
122	31387.0
1	31967.0
54	33213.0
209	34068.0
110	34594.0
206	35002.0
112	36144.0
109	37809.0
21	38384.0
105	39491.0

---

124	40271.0
57	44645.0
34	44717.0
111	47558.0
128	47985.0
11	49770.0
17	51114.0
14	53329.0
110	34594.0
206	35002.0
112	36144.0
109	37809.0
21	38384.0
105	39491.0
124	40271.0
57	44645.0
34	44717.0
111	47558.0
128	47985.0
11	49770.0
17	51114.0
14	53329.0
125	58921.0
10	60074.0
116	67629.0
55	80138.0
102	90715.0
101	99006.0
27	111541.0
38	149524.0
121	219704.0
2	281429.0
120	444598.0
211	449862.0
117	554465.0
14	53329.0
125	58921.0
10	60074.0
116	67629.0
55	80138.0
102	90715.0
101	99006.0
27	111541.0
38	149524.0
121	219704.0
2	281429.0
120	444598.0
211	449862.0
117	554465.0

---

Fonte: elaborada pelo autor



## APÊNDICE E – Artigos relacionados ao projeto publicados

Current Microbiology (2018) 75:726–735  
<https://doi.org/10.1007/s00294-018-1438-8>



### Fungal Diversity of Human Gut Microbiota Among Eutrophic, Overweight, and Obese Individuals Based on Aerobic Culture-Dependent Approach

Francis M. Borges<sup>1</sup> · Thais O. de Paula<sup>1</sup> · Marjorie R. A. Sarmiento<sup>1</sup> · Maycon G. de Oliveira<sup>1</sup> · Maria L. M. Pereira<sup>1</sup> · Isabella V. Toledo<sup>1</sup> · Thiago C. Nascimento<sup>1</sup> · Alessandra B. Ferreira-Machado<sup>1</sup> · Vânia L. Silva<sup>2</sup> · Cláudio G. Diniz<sup>1</sup>

Received: 10 February 2017 / Accepted: 18 January 2018 / Published online: 24 January 2018  
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

Fungi have a complex role in the intestinal tract, influencing health and disease, with dysbiosis contributing to obesity. Our objectives were to investigate fungal diversity in human gut microbiota among eutrophic, overweight, and obese. Epidemiological and nutritional information were collected from adult individuals, as well as stool samples processed for selective fungi isolation and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (yeasts) or microculture (filamentous fungi). Further 18S rDNA sequencing was performed to confirm identification. The mean count of fungi was 241 CFU/g of feces. Differences in the population level of the filamentous fungi were observed within eutrophic and obese groups. Overall, 34 genera were identified. The predominant phylum was Ascomycota with 20 different genera, followed by Basidiomycota and Zygomycota. As for Ascomycota, the most prevalent species were *Panizomerces* sp., *Pteridillium* sp., *Conotha* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., and *Geotrichum* sp. (76.39, 65.28, 59.72, 58.53, 12.50, and 9.72%, respectively). As for Basidiomycota, *Trichosporon* sp. and *Rhodovoulia* sp. were the most prevalent (30.56 and 15.28%, respectively), and for Zygomycota, *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. were the most numerous (15.28 and 9.72%, respectively). As expected there is a microbiota shift towards obesity, with slightly higher diversity associated to eutrophic individuals. This microbiota shift seems also to be related to the nutritional behavior of the individuals, as observed that the macronutrients intake may be positively related to the different fungi occurrences. Other studies are needed to better understand relationships between microbiota and obesity, which could be used in future obesity treatments.

#### Introduction

The human gut microbiota is a diverse ecosystem in which microorganisms coexist and interact with their hosts [25–27]. Historically, most of the literature has been focused on gut bacteria [23, 24, 29]. However, fungi can be found in a variety of body regions and its inclusion in studies has become highly relevant [10, 26, 30]. The incidence of fungal infections has increased in immunosuppressed populations. Several diseases, such as inflammatory bowel disease, are associated with fungi microbiota. The fungi have a complex, multifaceted role in the gastrointestinal tract [3, 6, 11].

The microbial inhabitants of the gut are also implicated in the multifactorial etiology of obesity, which is now considered a pandemic [22]. There are several reports on gut bacterial diversity in obese patients relating the bacterial population shifts to changes in body weight mass [3]. However, few studies report the fungal microbiota in humans [10].

Considering the emergence of information on microbial ecology, the aim of this study was to investigate the fungal diversity of the human gut microbiota among eutrophic, overweight, and obese individuals in order to contribute reliable information on gut microbial ecology shifts between these individuals. We also aspire to build a consistent human gut-derived mycota to be available for further investigations on microbial ecology [29].

✉ Cláudio G. Diniz  
[claudio.diniz@ufjf.edu.br](mailto:claudio.diniz@ufjf.edu.br)

<sup>1</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

Article

## Obesity, Xenobiotic Intake and Antimicrobial-Resistance Genes in the Human Gastrointestinal Tract: A Comparative Study of Eutrophic, Overweight and Obese Individuals

Marjorie Raquel Anariba Sarmiento<sup>1</sup>, Thais Oliveira de Paula<sup>1</sup>, Francis Moneta Borges<sup>1</sup>, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado<sup>2</sup>, Juliana Alves Resende<sup>2</sup>, Ana Paula Boroni Moneta<sup>3</sup>, Sheila Cristina Potente Dutra Luqueti<sup>3</sup>, Dionela Evangelista Cesar<sup>4</sup>, Vânia Lúcia da Silva<sup>1</sup> and Claudio Galuppo Diniz<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil; marjorieanariba@gmail.com (M.R.A.S.); taia84fern@yahoo.com.br (T.O.d.P.); francisethborges@gmail.com (F.M.B.); alessandrafbferreira@yahoo.com.br (A.B.F.-M.); vaniacabr@gmail.com (V.L.d.S.)

<sup>2</sup> Department of Pharmacy and Nutrition, Federal University of Espirito Santo, 29500-000 Alegre, ES, Brazil; ja.alves.resende@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Nutrition, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil; apboroni@yahoo.com.br (A.P.B.M.); scpnettedutra@yahoo.com.br (S.C.P.D.L.)

<sup>4</sup> Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil; dionela.cesar@gmail.com

\* Correspondence: claudiodiniz@ufjf.edu.br; Tel./Fax: +55-32-2512-3213

Received: 25 February 2019; Accepted: 30 April 2019; Published: 7 May 2019



**Abstract** Although lifestyle and physiology in obese individuals are accepted to lead to changes in the intestinal microbiota, uncertainty remains about microbiota dysbiosis, and xenobiotics intake, as a source of selective pressure, independent of antimicrobial chemotherapy. The aim of this study was to compare the occurrence of antimicrobial-resistance genetic markers (ARG) in faecal specimens of eutrophic, overweight and obese individuals, and their correlation with xenobiotic intake and gut bacteria density. **Methods:** This was a cross-sectional case-controlled study including 72 adult participants with no record of intestinal or systemic diseases, or recent use of antimicrobials, grouped as eutrophic, overweight, or obese. Anthropometric profile, eating habits and oral xenobiotics intake were recorded. Faecal metagenomic DNA was used to screen for ARG by PCR, and to measure bacterial groups by fluorescence in situ hybridization (FISH). Student's *t* and Wilcoxon tests were used to compare means and differences in ARG detection (95% confidence intervals). Correlation analyses (odds ratio) and relationships between bacteria density and ARG were determined. **Results:** Increase in abdominal circumference, waist circumference, hip, waist-hip ratio, BMI, carbohydrate, fibres, and total calorie intakes were different from eutrophic to obese participants. Habitual use of antihypertensive and anti-inflammatory drugs, antacids, and artificial sweeteners were associated mainly with obesity and overweight. Nutritional supplements were associated to the eutrophic group. ARG screening showed differences being more frequent among obese, and positive for 27 genetic markers related to  $\beta$ -lactams, tetracyclines, the macrolide lincosamide and streptogramin group, quinolones, sulfonamides, aminoglycosides, and efflux pump. Positive correlation between ARG and BMI, calorie intake, and intake of xenobiotics, was observed for obese individuals. Relationships among ARG detection and bacteria densities were also different. **Conclusions:** This study reinforces the hypothesis that obese individuals may harbour an altered gut microbiota, if compared to eutrophic. The overweight individuals display a transitional gut microbiota which seems to be between eutrophic and obese. Furthermore, the increased xenobiotic intake associated to obesity may play an important role in the antimicrobial resistance phenomenon.

## APÊNDICE F – Artigo em fase de revisão para submissão em periódico

### ELUCIDATION OF FECAL BACTERIAL DIVERSITY IN EUTROPHIC, OVERWEIGHT AND OBESE INDIVIDUALS USING DIFFERENT MOLECULAR TECHNIQUES.

Thais O. de Paula, Francis M. Borges, Marjorie R. A. Sarmiento, Alessandra B. Ferreira-Machado, Vânia L. Silva, Cláudio G. Diniz

Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author: Cláudio Galuppo Diniz

Email address: claudio.diniz@ufjf.edu.br

Telephone: +55 (32) 2102-3213

Fax: +55 (32) 2102-3227

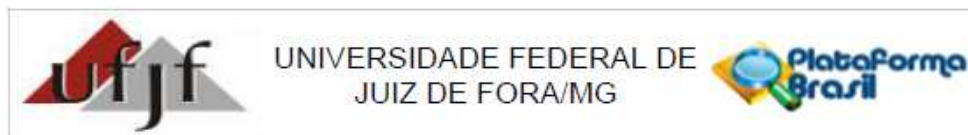
#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Pós-Graduate Program in Health and Pro-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ/UFJF). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### Abstract

Obesity is currently a worldwide public health threat, being considered a pandemic multifactorial disease related to the human Intestinal Microbiota (HIM). However, most of the studies on HIM and obesity are based on small sample size and diverse methodological approaches, which results in difficulties for data comparisons. As regional and social behavior can play an important role in the modulation of HIM, this study focused on the investigation of bacterial diversity in obese, overweight and eutrophic Brazilian individuals, using molecular techniques widely described in the literature and involving studies of Intestinal Microbiota. Volunteers (n=72) were evenly classified according to their body mass index. Nutritional, clinical, social parameters were recorded. Fresh fecal samples were collected and homogenized. Overall, 62% of obese were hypertensive, whereas only 12% of overweight and 4% of eutrophic were. Most of the obese were rated as low income (80%). Lower relative bacterial densities were observed in obese compared to eutrophic for almost all taxa studied (p < 0.05) with the Firmicutes / Bacteroidetes ratio (> 1) increased in obese using the FISH technique. Overweight individuals presented bacterial density representative of HIM with higher probability of obesity. All the participants were clustered in 3 different groups based on the PCR-DGGE fingerprint patterns (C1, C2, C3). The cluster C1 comprised mostly obese, whereas eutrophic individuals were highly representative in C3. The cluster C2 showed to be transitional. Taxonomic analysis using new generation sequencing showed that Bacteroidetes was the predominant phylum in the three groups, followed by Firmicutes phylum. The comparative analysis of the relative abundance of the main phyla in the three groups showed a significant difference in Verrucomicrobia phylum between eutrophic and obese groups (value of P = 0.0448). No statistically significant difference was observed in the Firmicutes/ Bacteroidetes ratio between the three groups as

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



### 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.

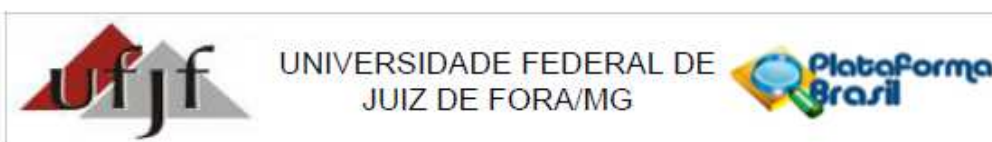
#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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@ufjf.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@uff.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 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 KÉLMER, 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 – Questionário quantitativo de frequência alimentar adaptado.

<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</b> <b>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	D S M			
	<b>N 1 2 3 4 5 6</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
<b>Gorduras</b>					
Margarina convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Margarina Light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maionese convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maionese light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Azeite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

	<b>N</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>D S M</b>			
	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>							
<b>Cereais</b>											
Arroz	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Arroz integral	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Arroz temperado	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Batata Frita	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Mandioca Frita	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Batata cozida	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Mandioca cozida	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Angu	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Milho Verde	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Macarrão	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Lasanha	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Macarrão instantâneo	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Coxinha	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Quibe	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							
Esfiha/ enroladinho	N	1	2	3	4	5	6	D S M			
	7	8	9	10							

<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</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
	<b>N 1 2 3 4 5 6</b> <b>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</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			
	<b>N 1 2 3 4 5 6</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			

### Leguminosas

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	D S M			
Soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	<b>N 1 2 3 4 5 6</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			

### Verduras/ legumes

Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Agrião	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Couve	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Couve flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

Cenoura crua	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Cenoura cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abóbora cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Chuchu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Quiabo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pepino	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Sopas _____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	<b>N 1 2 3 4 5 6</b> <b>7 8 9 10</b>	<b>D S M</b>			