

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS- GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Francis Moreira Borges

**Caracterização de fungos intestinais cultiváveis e avaliação
da estrutura da microbiota intestinal humana de indivíduos
obesos, com sobrepeso e eutróficos**

**Juiz de Fora
2018**

FRANCIS MOREIRA BORGES

Caracterização de fungos intestinais cultiváveis e avaliação da estrutura da microbiota intestinal humana de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de Concentração: Doenças Infecto-parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar

FRANCIS MOREIRA BORGES

Caracterização de fungos intestinais cultiváveis e avaliação da estrutura da microbiota intestinal humana de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Maria Christina Marques Nogueira Castañon
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Rosane Christine Hahn
Universidade Federal do Mato Grosso

Prof^o. Dr^o. Eduardo Robson Duarte
Universidade Federal de Minas Gerais

DESENVOLVIMENTO

Centro de Estudos em Microbiologia
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB/UFJF

Laboratório de Ecologia e Biologia Microbiana
Departamento de Biologia, ICB/UFJF

COLABORAÇÃO

Prof. Dr^o. Márcio Tavares Rodrigues
Dr^a. Juliana Alves Resende
Dr^a. Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Thaís Oliveira de Paula, MSc.
Marjorie Raquel Anariba Sarmiento, MSc.
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB/UFJF.

Profa. Dr^a Ana Paula Boroni Moreira
Profa. Dr^a Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti
Departamento Nutrição, ICB/UFJF

Prof. Dr. Thiago César Nascimento
Faculdade de Enfermagem - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório Côrtes Villela Medicina Laboratorial, Juiz de Fora, MG

APOIO FINANCEIRO

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu amado filho Vítor, minha maior inspiração e meu grande incentivador! Ao meu marido Walter pelo apoio incondicional, paciência e compreensão nos momentos de ausência. Aos meus pais, Maria Marta Fonseca e Robert Ozorio Moreira pelo apoio e suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela força e sabedoria para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz, pela oportunidade confiança, ensinamentos e por acreditar no meu trabalho.

Agradeço às minhas co-orientadoras, Prof. Dr^a. Vânia Lúcia da Silva e Prof. Dr^a. Dionéia Evangelista Cesar pelo carinho, paciência e conhecimentos compartilhados.

Agradeço às professoras do departamento de nutrição Prof. Dr^a. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti e Prof. Dr^a. Ana Paula Boroni Moreira e às pós-doutoras do Centro de Estudos em Microbiologia, Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Dr^a. Juliana Alves Resende, Dr^a. Analice Cláudia Azevedo e Dr^a. Julliane Dutra Medeiros por todo o apoio, paciência, ensinamentos e carinho.

Agradeço à Msc. Thaís e Msc. Marjorie pela parceria e amizade na execução do projeto.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Maycon, Isabela, Maria Luiza, Patrícia e Bruna por toda a dedicação e parceria.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Microbiologia da UFJF pela confiança, pelas oportunidades de trabalho e crescimento profissional e por sempre me receberem com tanto carinho. À Prof. Dr^a. Rosângela Abreu Monteiro de Barros e ao Prof. Dr^o. Márcio Tavares Rodrigues responsáveis pelo início da minha paixão pela micologia e pelo incentivo neste trabalho.

Aos meus professores da iniciação científica, Prof. Dr^o. Marcus Luiz de Oliveira Penido, Prof. Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos e professores do mestrado, Prof. Dr^a. Maria Aparecida de Resende Stoianoff e Prof. Dr^o. Orlando Vieira de Sousa, responsáveis pelo meu encantamento pela ciência.

A todos do Centro de Estudos em Microbiologia pela paciência e parceria.

Aos meus amigos e colegas de profissão que sempre me inspiram e apoiam, Prof. Dr^a. Priscila de Faria Pinto e Prof. Dr^o. Marcelo Silva Silvério.

A todos os voluntários que participaram deste projeto, muito obrigada pela confiança e disponibilidade, sem vocês essa pesquisa não seria possível.

Aos meus familiares pela torcida.

“As futuras gerações algum dia vão rir da tolice dos filósofos materialistas modernos. Quanto mais estudo a natureza, mais fico maravilhado com os feitos do criador. Oro enquanto estou trabalhando no laboratório.”

Louis Pasteur

RESUMO

Os fungos têm um papel complexo no trato intestinal, influenciando diretamente na saúde e na doença e sua disbiose pode contribuir para a obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos da microbiota intestinal humana entre indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Foram coletados espécimes fecais de 72 indivíduos adultos e análises dependentes e independentes de cultivo foram realizadas para avaliar os fungos presentes. As leveduras foram identificadas pela técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a analisador do tipo espectro de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) e os fungos filamentosos por microcultivo. A contagem média de fungos filamentosos e leveduras cultiváveis foi de $1,58 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ de fezes. Diferenças significativas no nível populacional dos fungos filamentosos foi observado entre os grupos dos indivíduos eutróficos e obesos. Trinta e quatro gêneros de fungos foram identificados. O filo predominante foi *Ascomycota* com 29 gêneros e/ou espécies diferentes, seguido por *Zigomycota* e *Basidiomycota*. O fungo mais isolado nos indivíduos eutróficos foi *Paecylomyces* sp. e nos indivíduos obesos *Penicillium* sp. Os indivíduos eutróficos apresentam uma diversidade ligeiramente maior de fungos filamentosos do que os indivíduos obesos. Os indivíduos do sexo feminino tiveram um maior número de fungos diferentes quando comparados aos do sexo masculino. A análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) mostrou agrupamento dos indivíduos eutróficos e com sobrepeso em um cluster e dos indivíduos obesos em outro cluster distinto, embora a riqueza tenha sido baixa nos três grupos. A análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) demonstrou maior densidade relativa de *C. albicans* no grupo obeso quando comparado ao eutrófico e pela análise de reação da polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) um número maior de cópias de DNA de fungos e do filo *Ascomycota* nos indivíduos obesos quando comparado aos indivíduos com sobrepeso e obesos. Foi verificada correlação positiva entre os fungos e os parâmetros antropométricos colesterol total, LDL, triglicerídeos, hemoglobina, HOMA-IR, HOMA- β , insulina, glicose sérica, creatinina e porcentagem de fibras e carboidratos da dieta. Outros estudos são necessários para melhor compreender a interrelação entre a micobiota do intestino e a obesidade. Futuramente, este conhecimento poderá ser utilizado na modulação da micobiota intestinal e no tratamento da obesidade.

Palavras chaves: Fungos filamentosos, leveduras, obesidade, micobiota intestinal

ABSTRACT

Fungi have a complex role in the intestinal tract, directly influencing health and disease and potential dysbiosis could contribute to obesity. The aim of this study was to investigate the fungal diversity of human gut microbiota among eutrophic, overweight, and obese individuals and to understand the gut microbial ecology shifts between healthy and obese individuals. Stool samples of 72 adult individuals were collected and dependent and independent cultive approach were performed to evaluate the fungi. The yeasts were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the filamentous fungi were identified by microculture. The mean count of filamentous fungi and yeast was $1.58 \log_{10}$ CFU/g of feces. Significant differences in the population level of the filamentous fungi was 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. The most prevalent specie was *Paecylomyces* sp. in eutrophic individuals and *Penicillium* sp. in obese individuals. The results of the eutrophic individuals suggest a slightly higher diversity of fungi within these individuals. Female individuals had a greater diversity of fungal types compared to males. The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis showed the grouping of eutrophic and overweight individuals in one cluster and of obese individuals in another cluster, although richness was low in all three groups. The fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis showed a higher relative density of *C. albicans* in the obese group when compared to eutrophic and by the quantitative real time PCR (qPCR) a larger number of DNA copies of fungi and the phylum Ascomycota in obese individuals when compared to overweight and obese individuals. There was a positive correlation between fungi and the anthropometric parameters, total cholesterol, LDL, triglycerides, hemoglobin, HOMA-IR, HOMA- β , insulin, serum glucose, creatinine and percentage of dietary fibers and carbohydrates. Other studies are needed to better understand the causal relationship between gut mycobiota and obesity. This knowledge could be used in modulating the gut mycobiota and identifying future obesity treatments.

Key Words: mold, yeast; obesity; intestinal mycobiota

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sondas, táxons, sequências e concentração de formamida utilizadas nos experimentos de FISH.	61
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR.	62
Tabela 3. Características antropométricas dos participantes do estudo.	67
Tabela 4. Características sociodemográficas dos participantes do estudo.	68
Tabela 5. Características clínicas e comportamentais dos participantes do estudo.	69
Tabela 6. Dados laboratoriais dos participantes do estudo.	70
Tabela 7. Contagens de fungos totais, filamentosos e leveduras isoladas dos três grupos de indivíduos.	73
Tabela 8. Distribuição qualitativa e abundância relativa de fungos filamentosos e leveduras isolados de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.	76
Tabela 9. Diversidade da composição da microbiota intestinal humana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos relacionados a riqueza.	82
Tabela 10. Estatística descritiva dos dados de quantificação absoluta por PCR em tempo real do DNAr 18S de fungos nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.	87
Tabela 11. Quantificação relativa por PCR em tempo real do DNAr dos filos Ascomycota e Basidiomycota em amostras de fezes de indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.	90
Tabela 12. Estatística descritiva da quantificação de fungos totais, leveduras e <i>Candida albicans</i> por Hibridização in situ fluorescente (FISH).	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Micobiota humana.....	26
Figura 2. Micobiota humana e sistema imune.....	27
Figura 3. Receptores da resposta imune e vias de sinalização envolvidas no reconhecimento de fungos.....	39
Figura 4. Representação esquemática do DNAr.....	48
Figura 5. Representação do funcionamento do MALDI-TOF MS.....	58
Figura 6. Ingestão calórica dos participantes do estudo.....	71
Figura 7. Média da ingestão de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.....	72
Figura 8. Diagrama de Venn representativo da diversidade de fungos e agrupamento qualitativo de acordo com sua ocorrência exclusiva ou compartilhada entre indivíduos do sexo feminino e masculino.....	74
Figura 9. Diagrama de Venn representativo da diversidade de fungos e agrupamento qualitativo de acordo com sua ocorrência exclusiva ou compartilhada entre indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	75
Figura 10. Abundância relativa dos fungos e distribuição entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	78
Figura 11. Estimativa da diversidade dos fungos entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	79
Figura 12. Relação entre microbiota humana intestinal cultivável e macronutrientes. (a) Mapa de correlação de Spearman demonstrando associações entre contagem de fungos totais, fungos filamentosos e leveduras (UFC/g de fezes) com os dados de macronutrientes.....	81
Figura 13. Análise da variável riqueza entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obeso.....	83
Figura 14. DGGE <i>fingerprinting</i> e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene de fungos DNAr 18S amplificado a partir do DNA metagenômico extraído de amostras de fezes. Cluster 1 constituído majoritariamente por indivíduos eutróficos; Cluster 2 - constituído majoritariamente por indivíduos obesos e Cluster 3 - constituído majoritariamente por indivíduos com sobrepeso.....	84

Figura 15. Agrupamento dos indivíduos participantes do estudo de acordo com o perfil de bandas correspondentes à região do RNA18S de fungos amplificadas a partir do DNA metagenômico extraído de amostras de fezes separadas por DGGE.....	85
Figura 16. Análise de Correlação Canônica (CCA) entre as comunidades fúngicas determinada pelos genes DNAr 18S e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.....	86
Figura 17. Contagem média de cópias de DNA/g de fezes de fungos nos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso ($p < 0,05$).	87
Figura 18. Mapa de calor de correlação de Spearman entre o número de cópias de DNAr 18S de fungos e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso.....	88
Figura 19. Análise de Componente Principal (PCA) entre o número de cópias de DNAr 18S de fungos e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso.....	89
Figura 20. Quantificação relativa do DNAr dos filos Ascomycota e Basidiomycota em amostras de fezes de indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.....	90
Figura 21. Micrografia de lâmina hibridizada com sonda FUN para contagem de fungos totais em indivíduos obesos (a) e eutróficos (b) pela técnica de FISH. 91	91
Figura 22. Quantificação de fungos totais, leveduras e <i>C. albicans</i> por Hibridização in situ fluorescente (FISH). FUN: sonda fungos totais; PF2: sonda leveduras e Caal: sonda <i>Candida albicans</i>	92
Figura 23. Mapa de calor de correlação de Spearman entre a quantidade de fungos totais, leveduras e <i>Candida albicans</i> e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso..	93
Figura 24. Análise de Componente Principal (PCA) entre a densidade de fungos totais, leveduras e <i>Candida albicans</i> ($\mu\text{m}^2/\text{g}$ de fezes) e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso.....	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Obesidade.....	18
2.2	Sistema imune e obesidade.....	20
2.3	Microbiota intestinal e obesidade.....	21
2.4	Microbiota fúngica.....	24
2.4.1	Micobiota da pele.....	27
2.4.2	Micobiota do trato urogenital feminino.....	29
2.4.3	Micobiota do pulmão.....	30
2.4.4	Micobiota da cavidade bucal.....	32
2.4.5	Micobiota do trato gastrintestinal.....	34
2.4.6	Micobiota intestinal e obesidade.....	43
2.5	Métodos de estudo de ecossistemas microbianos intestinais.....	46
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral.....	51
3.2	Objetivos específicos.....	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	Delineamento do estudo.....	53
4.2	Avaliação antropométrica e do consumo alimentar.....	53
4.3	Análises bioquímicas.....	54
4.4	Coleta de amostras fecais e preparação para análises microbiológicas.....	54
4.4.1	Preparo das amostras para isolamento e quantificação dos fungos.....	55
4.4.2	Preparo das amostras para realização da Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	55

4.4.3	Preparo das amostras para extração de DNA	55
4.5	Identificação dos fungos.....	56
4.5.1	Identificação dos fungos filamentosos	56
4.5.2	Identificação das Leveduras	56
4.5.3	Identificação molecular dos fungos isolados.....	58
4.6	Extração de DNA a partir dos espécimes fecais	58
4.7	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	59
4.7.1	Técnica de Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) para análise das leveduras	59
4.7.2	Técnica de Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) para análise dos fungos totais.....	59
4.8	PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	60
4.9	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	61
4.9.1	Amplificação de DNAr 18S de representantes do Reino <i>Fungi</i> utilizando oligoiniciadores específicos	62
4.9.2	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante	63
4.10	Análises Estatísticas	64
5	RESULTADOS	66
5.1	Perfil sociodemográfico, antropométrico e bioquímico dos participantes.....	66
5.2	Avaliação da composição nutricional da dieta dos participantes.....	71
5.3	Resultados das análises para fungos cultiváveis	73
5.4	Resultados das análises moleculares	82
5.4.1	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	82
5.4.2	PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	86
5.4.3	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	91
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS	108

APÊNDICE A – Ficha de identificação macroscópica dos fungos	121
APÊNDICE B - Artigos publicados	122
APÊNDICE C - Capítulos de livro	143
APÊNDICE D - Trabalho apresentado no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia	144
APÊNDICE E - Trabalhos apresentados no VIII Congresso Brasileiro de Micologia	145
APÊNDICE F - Outras atividades realizadas durante o período:	147
ANEXO A - Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF	148
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	150
ANEXO C – Ficha de anamnese e dados cadastrais	152
ANEXO D – Questionário quantitativo de frequência alimentar	156
ANEXO E – Ficha para dados antropométricos	162
ANEXO F - Classificação de alimentos com base no processamento industrial	163

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A microbiota intestinal humana (MIH) é considerada atualmente como um órgão essencial para o corpo humano. Está envolvida na fisiologia e na saúde humana e, além disso, o aumento das doenças relacionadas a esses microrganismos tem sido discutido. A MIH é um ecossistema diverso, no qual bactérias, arqueias, vírus e eucariotos coexistem e interagem entre si e com o hospedeiro. A aquisição da MIH é um processo complexo que envolve transmissão vertical e horizontal de microrganismos, e que começa antes do nascimento, sendo influenciada por diversos fatores, os quais incluem uso de antimicrobianos e outros fármacos, higiene pessoal e coletiva, comportamento social, hábitos alimentares, região geográfica e a globalização. Além disso, o estilo de vida moderno desempenha um papel importante na modulação da microbiota.

O estudo da MIH considera as bactérias como os microrganismos mais relevantes do trato gastrointestinal humano. Dessa forma, acredita-se que diversas funções biológicas atribuídas à microbiota intestinal estão exclusivamente relacionadas a esses microrganismos, tais como: defesa contra patógenos, imunomodulação, produção de energia, metabolismo de compostos alimentares não digeríveis, degradação de substâncias tóxicas, biotransformação de ácidos biliares conjugados, síntese de vitaminas e outros nutrientes e desenvolvimento de microvilosidades intestinais. Atualmente é reconhecido que os fungos podem ser encontrados na pele, pulmões, cavidade bucal, trato urogenital e gastrointestinal e que as condições ambientais nesses nichos podem variar drasticamente em termos de temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH e umidade. Portanto, a inclusão nos estudos da microbiota tornou-se necessária e altamente relevante.

A incidência de infecções fúngicas aumentou consideravelmente nas últimas duas décadas, principalmente de forma oportunista em indivíduos imunossuprimidos, como os pacientes portadores do HIV, submetidos a transplantes de órgãos ou quimioterapia antineoplásica. Além disso, doenças que anteriormente não eram associadas a fungos, como hepatite B, fibrose cística e doença inflamatória intestinal, são atualmente consideradas associadas à microbiota fúngica, e que pode ser crítica na progressão dessas doenças. No

entanto, a literatura na última década demonstrou que os fungos têm um papel complexo e multifacetado no trato gastrointestinal, sendo ativos na modulação da saúde ou da doença por interações entre os fungos e o hospedeiro e entre os fungos e os demais microrganismos da microbiota.

A microbiota do trato gastrointestinal está relacionada a processos metabólicos do hospedeiro, como a extração de energia alimentar e barreira intestinal à invasão por patógenos, estando, portanto, implicada na etiologia multifatorial da obesidade e suas comorbidades, como a resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares. Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial, principalmente relacionada às mudanças atuais no estilo de vida e à maior disponibilidade de alimentos ricos em energia. Considerando a microbiota bacteriana, existem vários trabalhos científicos sobre a diversidade de bactérias intestinais em pacientes obesos, relacionando alterações dos grupos bacterianos com mudanças na massa corporal. Entretanto existem poucos estudos sobre a microbiota fúngica comensal humana.

Assim, considerando-se a carência ou inexistência de estudos semelhantes no Brasil, além das fragilidades técnicas e metodológicas destacadas na literatura internacional e a real extensão do fenômeno considerando-se indivíduos de composições culturais diferentes, este estudo tem uma abordagem mais ampla, visando investigar comparativamente a diversidade de fungos da microbiota intestinal humana através da análise de espécimes fecais de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos com base em metodologias dependentes de cultivo e moleculares. Dessa forma, pretendemos contribuir com informações científicas sobre a associação das características sociais e de comportamento, clínicas e nutricionais com a diversidade fúngica no trato gastrointestinal, de maneira comparativa entre os três grupos analisados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade

A obesidade é considerada atualmente uma doença crônica de prevalência e incidência crescente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo, portanto, caracterizada como uma pandemia. Acomete indivíduos de todas as raças, faixas etárias e ambos os sexos (BORGES, 2011; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011; BAHIA et al., 2012). É uma doença de caráter multifatorial, determinada por fatores genéticos, ambientais, sociais, psicológicos e culturais. A interação entre esses fatores e atuação sobre mediadores fisiológicos de gasto e armazenamento de energia, resultam no fenótipo obeso (PI-SUNYER et al., 1998; FRANCISCHI et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um acúmulo excessivo de gordura, que representa um risco para a saúde do indivíduo (WHO, 2000). Estimativas preveem que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos. As crianças obesas e com sobrepeso podem atingir cerca de 75 milhões (ABESO, 2009).

Ocorre um aumento no risco de desenvolvimento de doenças crônicas e suas complicações em indivíduos com sobrepeso e obesos, o que aumentaria o índice de mortalidade associado a essas complicações (PI-SUNYER et al., 1998). Dentre as complicações associadas à obesidade destacam-se o diabetes, doenças cardíacas, hipertensão e alguns tipos de câncer, como o câncer colorretal (TILG e MOSCHEN, 2006; BAHIA et al., 2012), considerados desafios a serem combatidos no século XXI, devido ao seu aumento crescente e por estarem entre as principais causas de morte passíveis de prevenção (SEIDELL, 2000; PRENTICE, 2006; TILG e MOSCHEN, 2006).

O diagnóstico adotado pela OMS, devido à sua simplicidade e baixo custo, é feito através do índice de massa corporal (IMC), o qual consiste no cálculo da razão entre o peso do indivíduo e altura ao quadrado (Kg/m^2). O IMC apresenta boa correlação com o índice de gordura corporal medido por aparelhos e com a medida da circunferência da cintura, que não deve ser maior

que 94 centímetros no homem e 80 centímetros na mulher (PI-SUNYER et al., 1998; SPEAKMAN, 2004). A classificação dos indivíduos, de acordo com o IMC, é determinada como: abaixo do peso, IMC < 18,5 Kg/m²; normal, IMC entre 18,5 e 24,9 Kg/m²; sobrepeso, IMC entre 25 e 29,9 Kg/m²; obesidade grau I, IMC entre 30 e 34,9 Kg/m²; obesidade grau II, IMC entre 35,0 e 39,9 Kg/m² e obesidade grau III, IMC > 40 Kg/m² (WHO, 2000).

O excesso de peso somente não é o fator determinante para aparecimento de doenças e o risco associado no obeso, mas também à localização da gordura (WHO 2000; TILG e MOSCHEN, 2006; BAHIA et al., 2012). O acúmulo de gordura na região inferior ou quadril é chamado obesidade ginóide; já na região central ou abdominal é chamada obesidade andróide, sendo esta última vinculada a um maior risco relativo no desenvolvimento de comorbidades (FRANCISCHI et al., 2000).

A obesidade e as doenças associadas implicam em diminuição da qualidade de vida e longevidade dos indivíduos, podendo reduzir 5 a 20 anos na expectativa de vida, dependendo do grau de obesidade apresentado (FONTAINE e BAROFSKY, 2001). Nos Estados Unidos, a Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde revelou que 33% da população adulta é obesa e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (MOKDAD et al., 2003; OGDEN, CARROLL e FLEGAL, 2008). O aumento nas taxas de obesidade entre indivíduos jovens representa fator preocupante, visto que esses apresentarão riscos associados à obesidade durante um longo período de suas vidas (CABALLERO, 2007). No Brasil, 53,8% da população apresenta sobrepeso e 18,9% são obesos. (BRASIL, 2017). As alterações demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas nos últimos anos culminaram no aumento nos casos de obesidade no país, com consequente diminuição da desnutrição na população de uma maneira geral (FRANCISCHI et al., 2000).

Estimativas revelam que cerca de 2 a 6% dos gastos com a saúde no mundo são devidos às doenças relacionadas à obesidade e que o número de indivíduos obesos será o dobro do atual até 2050 no Brasil. Caso nenhuma medida preventiva seja tomada, e como consequência, o custo com a obesidade e doenças relacionadas aumentará substancialmente (SWINBURN et al., 2011; RTVELADZE et al., 2013).

2.2 Sistema imune e obesidade

A obesidade é considerada como um estado de inflamação crônica de baixo grau, o qual contribui para a resistência à insulina e conseqüentemente para o desenvolvimento da diabetes tipo-2 (BOSELLO e ZAMBONI, 2000; HERDER et al., 2013). A inflamação está associada a uma produção de citocinas inflamatórias e maior ativação das vias de sinalização inflamatórias (WELLEN e HOSTAMISLIGIL, 2003). O excesso de calorias característico da obesidade está diretamente relacionado com alterações em fatores metabólicos e impacto direto sobre o sistema imunológico (SIEGMUND et al., 2002). Vários estudos buscam identificar as subpopulações de células imunológicas que estão envolvidas no processo inflamatório do tecido adiposo, compreender os mecanismos que levam a inflamação deste tecido e desenvolver imunoterapias para reverter este processo (SIEGMUND et al., 2002; ALVEZ, 2006; HAN e LEVINGS, 2013).

O tecido adiposo tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir hormônios e moléculas sinalizadoras, como a leptina, que tem função de regulação do sistema imune, pois está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular. A adipocitocina, atua como protetor contra inflamação e interleucinas secretadas pelos adipócitos (IL-6 e IL-8). A leptina ativa linfócitos T, aumenta a resposta Th1 e ativa monócitos, entre outros, sendo considerada uma citocina pró-inflamatória (ALVEZ, 2006).

Após a descoberta da leptina, o tecido adiposo passou a ser visto como um órgão endócrino, capaz de secretar uma variedade de moléculas, que encontram receptores em diversas células do sistema imunológico. Portanto, a expansão deste tecido, observada na obesidade parece ter fortes impactos na resposta imune (TILG e MOSCHEN, 2006).

O aumento nos níveis de leptina circulante, juntamente à resistência central a esse hormônio que está relacionada com níveis reduzidos de grelina e adipocitocina estão associados ao processo inflamatório observado na obesidade (SIEGMUND et al., 2002).

Devido a essa inflamação crônica de baixo grau, indivíduos obesos possuem maiores níveis de citocinas inflamatórias circulantes, tais como: leptina, TNF- α e MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein-1*), que por sua vez é responsável por

atração de monócitos para o tecido adiposo (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2003). (MANCO et al., 2007; SMITH et al., 2007; VALERA MORA, 2007; ZHANG et al., 2009).

O tecido adiposo dos obesos se torna um sítio de células inflamatórias, secretoras de grandes quantidades de citocinas inflamatórias e quimiocinas, as quais atraem um maior número de células e contribuindo assim para a inflamação sistêmica (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007).

2.3 Microbiota intestinal e obesidade

A microbiota intestinal humana (MIH) é constituída por grande número de microrganismos distribuídos não homogeneamente, de acordo com as características de cada porção intestinal. Portanto, o colón é a porção que alberga o maior número de microrganismos devido, principalmente, à grande quantidade de nutrientes disponíveis, ausência de secreções intestinais e ao lento peristaltismo nesse local (VILLELA, 2004; QIN et al., 2010). Estima-se que a microbiota intestinal contenha cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (FLINT, 2011).

Os microrganismos presentes no trato gastrintestinal contribuem com funções, metabólicas; imunomoduladora; metabolismo de fármacos e desenvolvimento das microvilosidades (VILLELA, 2004; TURNBAUGH, 2006; DIBASE et al., 2008; TAGLIABUE e ELLI, 2013). A disbiose da microbiota intestinal pode culminar em distúrbios, como diabetes tipo 1 e 2, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável e câncer colorretal (XU et al., 2012; CLEMENTE et al., 2012).

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 gastrintestinal (CUI et al., 2013). Dentre as bactérias que compõem a MIH, predominam as anaeróbias estritas em uma ordem de magnitude até três vezes superior aos aeróbios facultativos e anaeróbios facultativos (LAGE e BRITO, 2012). Os filos dominantes são: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, representando 92,6% do total. Outros filos estão presentes em números variáveis, tais como *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (BRANDT, SAMPAIO e MIUKI, 2006; MORALES,

BRIGNARDELL e GOTTELAND, 2010; TAGLIABUE e ELLI, 2013). Algumas arqueias, como as metanogênicas, também estão presentes na microbiota intestinal, principalmente *Methanobrevibacter smithii* (KORECKA e ARELAMPALAM, 2012).

A composição da microbiota intestinal é influenciada pela genética e condições ambientais. Assim, ocorrem diferenças entre crianças, adultos e idosos, bem como entre os sexos e etnias e também quanto a principal fonte nutricional dos indivíduos, diferindo os perfis bacterianos de onívoros, herbívoros e carnívoros (SEKIROV et al., 2010; DAVE et al., 2012; KORECKA e ARELAMPALAM, 2012). A dieta tem impacto direto na composição da microbiota intestinal, influenciando as proporções e tipos de metabólitos produzidos. Dietas ricas em gorduras saturadas estão associadas a uma maior ocorrência de *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, enquanto que dieta rica em carboidratos está associada a maior ocorrência de *Firmicutes* e *Proteobacteria* (WU et al., 2011; CLEMENTE et al., 2012).

A forma de nascimento está relacionada a composição da comunidade microbiana intestinal nos primeiros meses de vida. O parto normal favorece o desenvolvimento de uma microbiota semelhante à encontrada no ambiente vaginal da mãe, constituída principalmente por *Lactobacillus* spp. e *Prevotella* spp., enquanto o parto cesáreo favorece o desenvolvimento de microbiota semelhante à da pele, composta principalmente por *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp., e também por microorganismos presentes no ambiente hospitalar (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ et al., 2015). A placenta não é um ambiente estéril e alberga microbiota restrita, porém, metabolicamente rica, composta principalmente pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* (NICHOLSON et al., 2012; AAGAARD et al., 2014). Já foi descrito na literatura o isolamento de bactérias no mecônio, tais como *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (NICHOLSON et al., 2012).

O período inicial de colonização coincide com a ativação do eixo hipotalâmico pituitária-adrenal, que tem impacto sobre o sistema nervoso entérico que inerva o trato gastrointestinal. As células enteroendócrinas do intestino segregam peptídeos, conhecidos por estarem ligados à ingestão alimentar, armazenamento de lipídeos e homeostase energética, e podem ser ativados por metabólitos microbianos (NICHOLSON et al., 2012). Na primeira infância, a

microbiota é instável e a composição está relacionada ao tipo de alimentação, doenças e uso de antimicrobianos (SEKIROV et al., 2010; CLEMENTE et al., 2012; DAVE et al., 2012). Aos três anos de vida, o indivíduo apresenta perfil de microbiota de adulto, que se modifica novamente no idoso (NICHOLSON et al., 2012; DORÉ e BLOTTIÈRE, 2015). Um conjunto final de mudanças relacionadas com a idade na composição e função da microbiota intestinal ocorre durante a velhice. O envelhecimento está associado a funções fisiológicas alteradas, incluindo a função do sistema imunológico, que interferem na composição da microbiota intestinal. As diferenças relacionadas às faixas etárias relativas à composição da microbiota intestinal incluem aumento no número total de anaeróbios facultativos, mudanças na proporção *Bacteroidetes/Firmicutes* com aumento das espécies de *Firmicutes* e uma diminuição acentuada de bifidobactérias em pessoas com mais de 60 anos de idade (NICHOLSON et al., 2012).

A alteração da microbiota de indivíduos obesos pode influenciar no ganho de peso e deposição de gordura, atuando na captação de nutrientes e produção de mais energia a partir da dieta e também interfere com a regulação e expressão de genes do hospedeiro relacionados com o armazenamento e gasto energético (DUNCAN et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2006; DELZENNE e CANI, 2011).

Evidências recentes têm sugerido o envolvimento da MIH na regulação energética, assim como no processo inflamatório, sendo, portanto, um fator ambiental relacionado à fisiopatologia da obesidade. Estudos utilizando modelos animais têm sugerido que a composição da MIH é diferenciada em indivíduos obesos e eutróficos (BERVOETS et al., 2013). Camundongos geneticamente modificados para o fenótipo obeso apresentaram maior porcentagem de bactérias do filo *Firmicutes* e uma diminuição de bactérias do filo *Bacteroidetes*, associados a produção extra de energia de 150 kcal (FLINT, 2011; XU et al., 2012; DEVARAJ, HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013). Devido às diferenças na composição da sua microbiota intestinal, as pessoas obesas podem ser mais eficazes na extração de energia dos alimentos e estimulação da lipogênese. Um aumento do lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, gera inflamação crônica de baixo grau (endotoxemia metabólica)

em camundongos, resultando em resistência à insulina, que pode atuar através de endocanabinóides produzidos pelo hospedeiro (NICHOLSON et al., 2012).

A participação das bactérias na composição da MIH é bem estabelecida, sendo conhecidas as principais espécies que compõem o trato gastrointestinal e sua implicação em diversas patologias, como a obesidade (CUI et al., 2013). Embora o papel das bactérias intestinais na modulação da resposta imune sistêmica e da fisiologia intestinal seja amplamente discutido, os efeitos de outros microrganismos comensais são desconhecidos (KIM et al., 2014).

2.4 Microbiota fúngica

Somente nos últimos dez anos o microbioma humano como um novo conceito microbiológico, o qual engloba a pesquisa de todos os microrganismos (bactérias, fungos, arqueias e vírus) como componentes da microbiota, vem sendo considerado. Essa conotação mudou em 2010, quando o termo micobioma (uma combinação das palavras micologia e microbioma) foi utilizado pela primeira vez para se referir ao microbioma fúngico (CUI et al., 2013).

Existem diversas razões para incluir o estudo da participação dos fungos na constituição da microbiota das diferentes partes do corpo. Alguns fatores reforçam esta mudança: (I) a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas duas últimas décadas, principalmente aquelas oportunistas, com o crescimento do número de pacientes imunossuprimidos, infectados pelo vírus HIV, transplantados ou em quimioterapia para tratamento do câncer; (II) doenças que eram consideradas como não associadas a fungos, tais como hepatite, fibrose cística e doenças intestinais inflamatórias, hoje parecem estar relacionadas ao micobioma de determinados locais e; (III) a interação entre os diferentes biomas e entre o hospedeiro e o micobioma são críticas na progressão das doenças (CUI et al., 2013).

Os fungos comensais provavelmente têm papel importante na saúde e na doença. A prevalência das infecções fúngicas está aumentando devido a imunossupressão por diversas causas, e as populações de fungos comensais podem ser a fonte de patógenos oportunistas. Além disso, alterações nas comunidades de fungos comensais podem ser relevantes em doenças que não são

primariamente fúngicas, tais como fibrose cística ou doença inflamatória intestinal. Assim, como as bactérias comensais são importantes para o desenvolvimento e regulação do sistema imunológico e competem umas com as outras por recursos no microambiente, também é provável que a exposição comensal a fungos influencie o sistema imunológico e que ocorra uma competição entre os fungos e desses com as bactérias por recursos. Assim como a disbiose bacteriana, alterações na micobiota podem ser uma característica importante para o surgimento ou agravamento de doenças (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Para entender o impacto das interações entre a micobiota e o sistema imunológico do hospedeiro é necessário conhecer a composição da micobiota em diferentes locais do corpo e compreender os mecanismos pelos quais o sistema imunológico interage com fungos nas superfícies mucosas e pele e as alterações nas populações fúngicas que podem estar relacionadas a patologias (UNDERHILL E ILIEV, 2014). Os fungos são prevalentes em várias regiões do corpo humano colonizadas por microrganismos, incluindo a pele, o trato gastrintestinal, geniturinário e respiratório e o pulmão (Figura 1). Mais de 390 espécies fúngicas foram descritas em seres humanos. Dependendo do habitat, a abundância de células fúngicas varia de < 0,1% no trato gastrintestinal até 10% na pele. Uma célula fúngica é em média cerca de 100 vezes maior do que uma célula bacteriana, o que traduz em uma significativa biomassa fúngica, fornecendo abundantes moléculas bioativas para o hospedeiro e modulando sua fisiologia (APOLONIO E MACHADO, 2018; HALWACHS et al., 2017).

Em estudo sobre a relação do tipo de parto e composição da microbiota dos recém-nascidos foi verificado que as abundâncias relativas dos grupos taxonômicos específicos de cada sítio anatômico diferiram pelo modo de nascimento, com significativamente mais fungos *C. albicans* presentes na pele de bebês nascidos de parto vaginal e significativamente mais fungos da espécie *C. orthopsilosis* presentes na cavidade bucal de crianças nascidas por cesariana no primeiro mês de vida. O micobioma de crianças é variável ao longo do primeiro mês de vida e o parto vaginal não resultou em micobioma infantil mais semelhante a micobiota vaginal da mãe. Portanto, embora a transmissão vertical de isolados fúngicos específicos de mãe para filho tenha sido relatada, é provável que outras

fontes (meio ambiente, outros cuidadores) também contribuem para o estabelecimento do microbioma na fase inicial da vida (WARD et al., 2018).

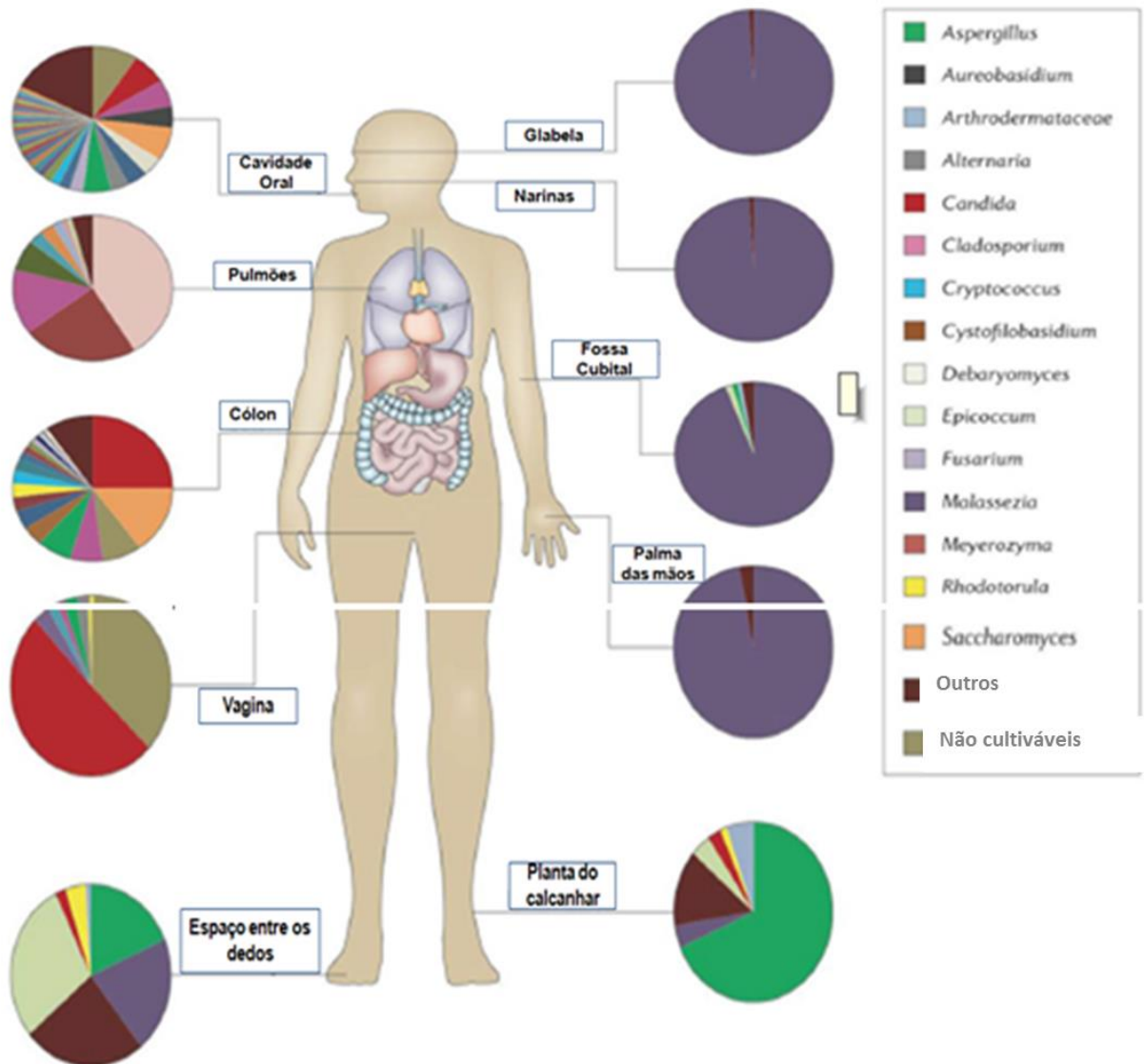


Figura 1. Micobiota humana. Fonte: Adaptado de UNDERHILL E ILIEV (2014).

A resposta imune do hospedeiro influencia a composição do microbioma (Figura 2). Vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em fagócitos, incluindo TLR-2, TLR-4, dectina-1, dectina-2 e galectina-3, reconhecem especificamente padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de fungos, mananas, β -1,3-glucanas e β -1,6-glucanas. Após esse reconhecimento de padrões, macrófagos e células dendríticas ativam células T através de um processo de apresentação de antígenos. Dependendo de quais citocinas são

estimuladas, as células T ativadas diferenciam-se em Th-1, o que promove a fagocitose de fungos, ou Th-2, que ativa células B para liberar anticorpos específicos contra fungos. Diferenciação de Th-17 após infecção por *C. albicans* foi observada, indicando um potencial papel de Th-17 na defesa do hospedeiro contra fungos (CUI et al., 2013).

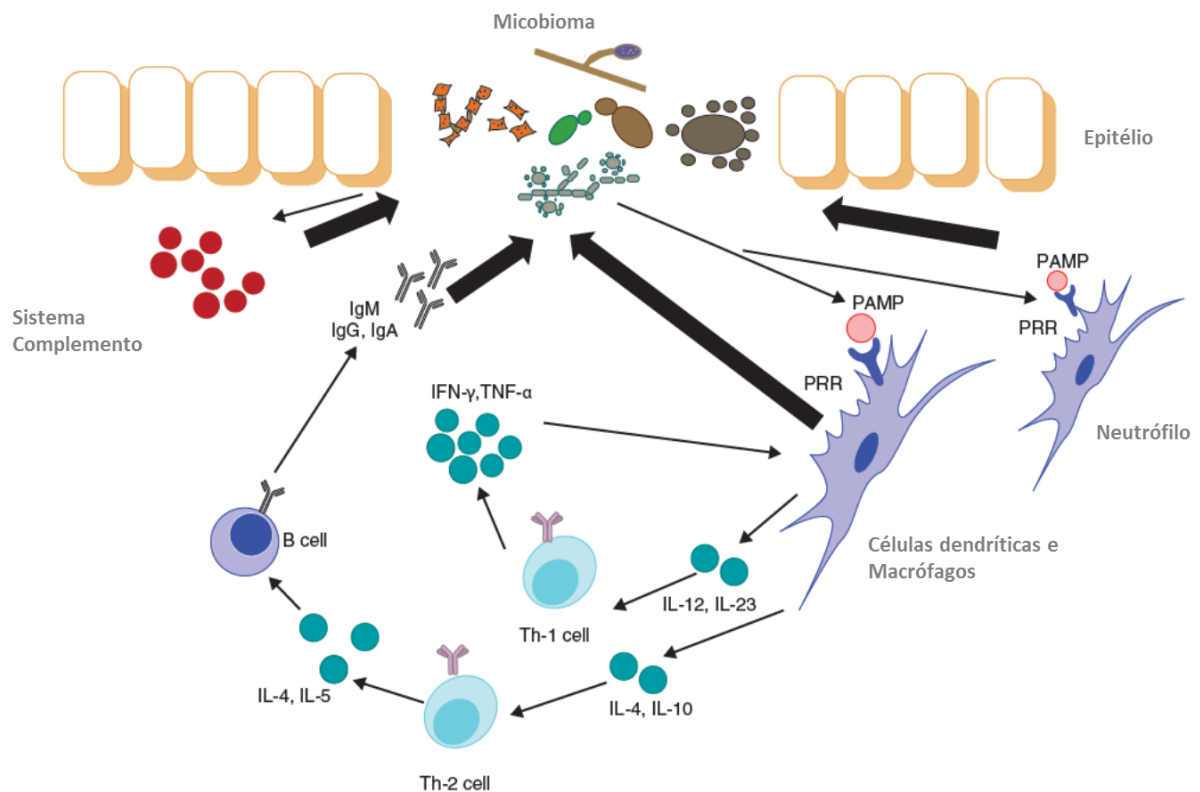


Figura 2. Micrôbiota humana e sistema imune. Fonte: Adaptado de CUI et al. (2013).

2.4.1 Micrôbiota da pele

A superfície da pele é o primeiro ponto de contato do corpo com bactérias e fungos provenientes do ambiente e alberga bilhões de microrganismos que desenvolveram uma relação comensal com o hospedeiro. Abordagens de sequenciamento massivo de alto rendimento demonstraram que a pele abriga uma microbiota bacteriana e fúngica única. Além disso, a microbiota da pele depende da natureza do local da pele, com padrões associados com microambientes úmidos, secos ou sebáceos. Como a pele é um órgão auto renovável, células mortas são

continuamente renovadas, proporcionando ambiente para o crescimento microbiano saprofítico (APOLONIO E MACHADO, 2018; CUI et al., 2013; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Abordagens dependentes de cultivo identificaram muitos fungos comensais associados à pele, sendo *Malassezia* o gênero mais comum, seguido por *Penicillium* e *Aspergillus*. Outros fungos tais como *Alternaria* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Cladosporium* spp. e *Mucor* spp. também foram cultivados, mas com uma frequência mais baixa. Estudos de sequenciamento independentes de cultivo confirmaram que o gênero *Malassezia* é o mais comumente representado em diferentes locais do corpo da pele humana saudável. A alta resolução dessas metodologias permitiu a identificação de espécies específicas e certas espécies de *Malassezia* spp. estão associadas a locais específicos do corpo. As espécies de *Candida* spp. também foram detectadas em todos os locais da pele do corpo e foram principalmente representadas por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, espécies diferentes daquelas que normalmente povoam o intestino humano. Enquanto locais como os pés revelaram a maior diversidade fúngica (40 a 80 gêneros), outros locais como testa, região próxima às narinas, dorso e palma das mãos apresentaram maior diversidade bacteriana do que de fungos. Essa correlação inversa entre a diversidade bacteriana e fúngica da comunidade pode ser devida à presença de nutrientes específicos em locais diferentes do corpo, e apontam para uma interação complexa entre as duas comunidades (APOLONIO E MACHADO, 2018; CUI et al., 2013; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Os doentes com imunodeficiências primárias sofrem de infecções fúngicas recorrentes. Embora cada imunopatologia resulte em imunodeficiência específica, uma característica comum de muitos é o desenvolvimento de eczema - um tipo de dermatite atópica. Ocorre uma relação direta entre a imunidade do hospedeiro e o efeito sobre a microbiota bacteriana e fúngica da pele em pacientes com imunodeficiências (ILIEV et al., 2017).

A diversidade da microbiota fúngica de outros gêneros diferentes de *Malassezia* está aumentada em pacientes com dermatite atópica, com aumento de espécies de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Cladosporium* spp. A análise da ocorrência simultânea de bactérias e fungos específicos sugeriu que as duas comunidades podem interagir (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Uma mutação no gene autossômico recessivo CARD9 pode levar a dermatofitoses profundas, que, ao contrário de uma doença mucocutânea superficial, acomete o tecido dérmico e subcutâneo, os linfonodos e, ocasionalmente, o sistema nervoso central, levando à mortalidade. Estes pacientes têm um número diminuído de células Th-17. Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes em IL-17A ou IL-23 são mais susceptíveis à infecção cutânea por *C. albicans*. A deficiência de IL-22 desempenha um papel importante em doenças mucocutâneas em humanos. Futuros estudos são necessários para elucidar o efeito da composição do microbioma sobre a imunidade em locais específicos do corpo em doenças que acometem a pele (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

2.4.2 Microbiota do trato urogenital feminino

Como outras superfícies mucosas, a vagina alberga uma microbiota composta por diversos microrganismos que, se não for contida adequadamente, pode causar patologias. Embora infecções fúngicas sejam comuns, estudos têm revelado população mais diversificada de fungos residentes do que anteriormente relatado. Essas pesquisas sugerem a presença de 11 a 20 gêneros diferentes, sendo os gêneros mais comumente detectados: *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Cladosporium*. Constatou-se que mudanças na diversidade fúngica estão associadas com diabetes, rinite alérgica e candidíase vaginal recorrente. O crescimento fúngico é controlado por outros membros da microbiota local e pelas defesas imunes do hospedeiro. As espécies de *Lactobacillus* spp. são os microrganismos dominantes na microbiota vaginal saudável. Essas bactérias produzem ácido láctico, que contribui para o baixo pH do ambiente. Os *Lactobacillus* spp. podem competir com espécies de *Candida* spp. pela ligação a células epiteliais (APOLONIO E MACHADO, 2018; CUI et al., 2013; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A ideia de que o sistema imunológico é responsável pela vigilância normal da microbiota fúngica vaginal é sugerida pela associação de variantes de genes imunes específicos com candidíase vaginal recorrente. Os doentes com mutação de paragem prematura na Dectina-1 associada à onicomicose também têm

candidíase vaginal recorrente, o que sugere que a Dectina-1 é importante para a contenção normal dos fungos vaginais. Outra variante genética para um polimorfismo de comprimento no íntron 4 de NLRP3 (gene codificador de NACHT, LRR e PYD que contêm a proteína 3) também tem sido associada com candidíase vaginal recorrente, sugerindo que os inflamassomas (complexo proteico oligomérico implicado na resposta imune inata) são importantes para a contenção de fungos vaginais. Em modelo animal, camundongos deficientes em NLRP3 são mais susceptíveis a doença invasiva em um modelo de infecção de mucosa por *Candida* spp. (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A lectina de ligação à manose (MBL) é um receptor de lectina do tipo C solúvel que se liga aos carboidratos na parede das células microbianas onde ativa a via do complemento e opsoniza os microrganismos para a fagocitose. Um polimorfismo genético na MBL que afeta o nível de expressão proteica está associado a candidíase vaginal recorrente, sugerindo que a MBL é importante para a contenção normal de fungos vaginais. Pequenas mutações em MBL também têm sido associadas a infecções fúngicas em outros locais de mucosa, tais como em defesa contra *Aspergillus* spp. no pulmão (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

2.4.3 Micobiota do pulmão

Há pouca evidência de uma microbiota comensal fúngica em pulmões saudáveis, embora os pulmões estejam constantemente expostos a fungos bucais e ambientais. Assim, o sistema imune da mucosa dos pulmões está exposto continuamente a fungos e antígenos fúngicos. Quando a função pulmonar normal está comprometida, como na fibrose cística, as comunidades fúngicas podem se fixar e colonizar este local. Os fungos comumente encontrados são *Aspergillus* sp. e *Scedosporium* spp., dois fungos filamentosos formadores de esporos encontrados no solo e em vários ambientes. Esses esporos são inalados regularmente e são normalmente eliminados sem desenvolvimento de patologias em indivíduos imunocompetentes por macrófagos alveolares que se ligam, internalizam e eliminam os esporos. Aqueles que escapam da resposta imune dos macrófagos alveolares podem se desenvolver formando hifas, as quais podem

invadir o tecido, atingir a circulação e se disseminar no organismo. A aspergilose disseminada é particularmente comum em pessoas que não possuem defesa eficaz por fagócitos polimorfonucleares para eliminação das hifas. *Aspergillus* spp. é também um alérgeno potente e a colonização das vias aéreas tem sido associada a asma grave e alergias nasais (APOLONIO E MACHADO, 2018; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

O reconhecimento de *Aspergillus* spp. nos pulmões é mediado em parte por receptores de reconhecimento de padrões incluindo lectinas do tipo C, como por exemplo, Dectina-1 e Dectina-2 e receptores do tipo Toll. Os esporos dos fungos são encapsulados em um invólucro ceroso que os protege do reconhecimento pela maioria dos receptores, mas quando os esporos rompem esse revestimento externo para germinar e crescer como hifas, são expostas várias proteínas de ligação da parede celular fúngica. Essa germinação geralmente ocorre no lúmen do pulmão, mas Dectina-1 também pode reconhecer os esporos de *Aspergillus* que germinam após a fagocitose por macrófagos pulmonares. Nesse caso, o receptor é localizado em fagossomas em vez da superfície celular e é ativado pela presença do fungo. O papel central dos macrófagos alveolares na depuração inicial de fungos inalados é ilustrado em camundongos que expressam a NADPH oxidase apenas em monócitos e macrófagos. Estes animais eliminam normalmente *Aspergillus* spp., enquanto que os camundongos deficientes em NADPH oxidase são altamente susceptíveis (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A infiltração inflamatória das células imunes é iniciada e o sistema imunológico adaptativo pode ser ativado quando os fungos sobrevivem ao seu primeiro encontro com macrófagos pulmonares. A resposta celular do tipo Th1 é geralmente protetora contra *Aspergillus* spp., enquanto que as respostas do tipo Th2 está geralmente associada a resultados não eficazes. No entanto, alguns relatórios sugerem que as respostas das células Th-17 são ainda mais importantes do que a resposta das células Th1. De fato, foi demonstrado que a sinalização de Dectina-1 é especificamente importante para diminuir a resposta Th1 e promover resposta de células Th17 a *Aspergillus* spp. Além disso, a Dectina-1 é importante para estimular a produção de IL-22, uma citocina associada a Th17 com propriedades pró e anti-inflamatórias. Além disso, demonstrou-se que a Dectina-2 tem um papel importante na regulação da produção de IL-17 por um subconjunto

de receptores relacionados com receptores de ácido retinóico (ROR γ t) expressando neutrófilos em resposta a *Aspergillus* spp. (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Tão importante quanto a imunidade contra fungos nos pulmões é a necessidade de prevenir a inflamação alérgica em resposta a antígenos fúngicos. As respostas alérgicas a *Aspergillus* spp. em modelo de camundongos é altamente dependente do reconhecimento de Dectina-1 do fungo e da capacidade deste receptor para promover a produção de IL-22 pelas células T. No entanto, os mecanismos que promovem a inflamação alérgica são provavelmente altamente dependentes do tipo de fungo como ilustrado pela observação de que enquanto as respostas a *Aspergillus* spp. são promovidas pela Dectina-1, as respostas a *Cladosporium* sp. foram independentes de Dectina-1 e IL-17. Os fungos comensais no intestino podem ter um impacto significativo na natureza da inflamação nos pulmões. Exatamente como essa conexão funciona e se ela interfere preferencialmente respostas a receptores fúngicos são questões importantes que ainda não foram totalmente elucidadas. É possível que a PGE2 produzida por fungos intestinais influencie os macrófagos nos pulmões (ILIEV et al., 2017).

2.4.4 Micobiota da cavidade bucal

A cavidade bucal é um ambiente bem conhecido para o crescimento microbiano, embora os membros fúngicos desta comunidade raramente tenham sido avaliados. A mais completa avaliação independente de cultura da micobiota bucal saudável demonstra a presença de mais de 75 gêneros fúngicos diferentes, sendo *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus* e *Fusarium* os mais comuns (APOLONIO E MACHADO, 2018; CUI et al., 2013; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A natureza da resposta imune do hospedeiro a micobiota bucal ainda não foi avaliada. No entanto, é bem conhecido que indivíduos imunossuprimidos (como pacientes com HIV ou submetidos a quimioterapia) desenvolvem frequentemente candidíase orofaríngea, demonstrando que a imunidade local é necessária para conter pelo menos espécies de *Candida* spp. Não se sabe se a imunidade local

influencia a colonização ou o crescimento de outras espécies de fungos (ILIEV et al., 2017).

Estudos genéticos em humanos fornecem indicações sobre os tipos de imunidade que são necessários para a contenção de espécies de *Candida* na mucosa bucal. Candidíase mucocutânea crônica é uma condição caracterizada por infecções recorrentes na boca, pele e outras superfícies mucosas. As mutações no transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (codificada por STAT1), uma molécula de sinalização importante para as respostas a IFN γ , IL-17 e IL-22, tornam os pacientes altamente susceptíveis a candidíase mucocutânea crônica, em todos os casos sendo observadas patologias bucais. Além disso, as mutações nos genes que codificam IL-17RA, IL-17F e a proteína adaptadora CIKS (ACT1), uma proteína necessária para a sinalização de IL-17R, têm sido associadas à candidíase mucocutânea crônica (ILIEV et al., 2017). Esta susceptibilidade à infecção por *Candida* spp. na cavidade bucal também pode ser causada por uma doença autoimune autossômica recessiva denominada distrofia ectodérmica-candidíase-poliendocrinopatia autoimune (APECED), em que as mutações no AIRE (gene regulador autoimune) induz à produção de auto anticorpos contra IL-17A, IL-17F e IL-22. Camundongos com deficiências na via da IL-17 também foram mais suscetíveis à candidíase bucal. Juntos, esses achados destacam a notável importância da imunidade Th-17 na contenção de patologia causada pela colonização por *Candida* spp. (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A resposta imune inata que ativa células Th-17 também pode ser inferida a partir de estudos genéticos. Pessoas com deficiências genéticas em CARD9 são altamente suscetíveis a infecções invasivas por *Candida* spp., com histórico de infecção da cavidade bucal. Pacientes com deficiência de CARD9 apresentaram diminuição do número de células Th17. Em modelo animal (camundongos) de infecção por *Candida* spp. bucal foi confirmado que CARD9 é necessário para a montagem de resposta de células Th-17, embora as respostas inatas dependentes de IL-17 não envolvam CARD9. Dos receptores que podem ativar CARD9, o papel da Dectina-1 foi explorado em modelo utilizando camundongos e verificou-se que era importante para defesa eficaz (ILIEV et al., 2017). Uma mutação no gene que codifica Dectina-1 em seres humanos tem sido associada à onicomiose, e não à candidíase orofaríngea. Isto pode sugerir que a Dectina-1 não está envolvida na

imunidade antifúngica bucal em humanos. Outros receptores de fungos, tais como Dectina-2, podem sinalizar através de CARD9, e essa redundância pode explicar a doença bucal mais grave na ausência de CARD9. Serão necessários mais estudos para determinar o papel de receptores adicionais como a Dectina-2 na imunidade contra fungos na cavidade bucal (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

2.4.5 Micobiota do trato gastrintestinal

Os fungos são habitantes normais do trato gastrintestinal dos mamíferos. As espécies de *Candida* spp. têm sido cultivadas com sucesso a partir do intestino de indivíduos saudáveis e o aumento da colonização dessa levedura no intestino tem sido observado em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII). Os primeiros estudos independentes de cultivo da micobiota de camundongos utilizando análises de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP) revelaram uma comunidade altamente diversificada de fungos em intestino de camundongos. Em humanos, a análise de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) do DNAr 18S fúngico revelou perfis diferenciais entre pacientes com colite ulcerativa e indivíduos saudáveis (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Os estudos iniciais sugeriram que o intestino humano é composto por uma microbiota fúngica diversa. Entretanto, as abordagens dependentes de cultivo são trabalhosas e semi-quantitativas, e não podem ser usadas para avaliar a variedade fúngica em profundidade. Mais recentemente, abordagens de sequenciamento de alto rendimento têm sido utilizadas para explorar comunidades fúngicas que povoam o intestino humano. Esses estudos revelaram que o intestino alberga mais de 50 gêneros de fungos, com espécies de *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. e *Cladosporium* spp. sendo particularmente comuns (Figura 1). Com relação às espécies de *Candida*, um estudo relatou que *Candida tropicalis* é mais comum em camundongos, enquanto *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* são mais frequentes em humanos. Apenas alguns dos fungos intestinais mais comuns foram encontrados em alimentos para camundongos, sugerindo que a maioria é nativa do intestino (HUSEYIN et al., 2017; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Os fungos detectados no intestino humano podem ser divididos em residentes (ou autóctones) e não residentes. Como requisito mínimo, um fungo residente deve ser capaz de crescer a 37 °C para colonizar o intestino. Para algumas poucas espécies do amplo e diverso gênero *Candida*, o trato digestivo dos mamíferos pode ser considerado o principal nicho. Espécies incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* podem ser encontradas como componentes do microbioma humano, e a *C. albicans* está presente em cerca de 30 a 60% dos indivíduos saudáveis. Além disso, muitas dessas espécies não parecem ter um nicho além de mamíferos vivos, não sendo encontradas em concentrações significativas no ar, no solo ou alimentos (HUSEYIN et al., 2017; HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016).

Fungos filamentosos dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e as leveduras dos gêneros *Geotrichum* e *Galactomyces* são relatados como colonizadores do trato gastrointestinal. *Cladosporium* spp. tem sido descrito no trato gastrointestinal de humanos saudáveis (Íleo e amostras fecais) desde 1969 e foi amplamente encontrado na microbiota dos astronautas da nave espacial Apollo. *Galactomyces* foi encontrado em 22% dos estudos de fungos intestinais. Uma espécie filogeneticamente próxima a *Geotrichum gigas* foi detectada em 54% de 69 amostras (HALLEN-ADAMS E SUHR, 2016). O gênero *Mucor* foi também descrito em amostras de fezes de indivíduos saudáveis (HUSEYIN et al., 2017; RODRÍGUEZ, 2015).

Estudos em filhotes de camundongos e bebês humanos sugeriram que as comunidades bacterianas no intestino são inicialmente instáveis, mas se tornam mais estáveis na primeira infância e na idade adulta. No entanto, o mesmo não ocorre com a microbiota intestinal. Um estudo recente demonstrou que as populações de fungos no intestino de camundongos exibiram variação episódica ao longo de vários meses, embora a comunidade bacteriana permanecesse relativamente estável. Isto sugere que as populações fúngicas são mais variáveis e podem ser influenciadas por fungos no ambiente. Outra explicação pode ser que as bactérias são mais abundantes do que fungos e que uma consequência disso é que suas comunidades são mais robustas do que as comunidades de fungos. Em seres humanos foi verificado que a microbiota intestinal de recém-nascidos não era diferente da microbiota de adultos, e que a diversidade não se altera ao longo do

primeiro mês de vida sendo os fungos predominantes *C. albicans* e *C. parapsilosis* (WARD et al., 2018). Alterações na dieta também podem influenciar a microbiota fúngica; em seres humanos, o consumo de dieta à base de vegetais tem sido associado a aumento de populações de *Candida* spp., enquanto o consumo de uma dieta rica em proteínas está associado a expansão das espécies de *Penicillium* spp. (HUSEYIN et al., 2017; RODRÍGUEZ, 2015; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

2.4.5.1 Interação entre micobiota e microbiota bacteriana intestinal

No intestino, as comunidades de fungos e bactérias, sem dúvida, coexistem e interagem, influenciando uns aos outros. Fungos comensais foram encontrados no intestino de camundongos coexistindo juntamente com bactérias. Os camundongos “germfree” são altamente suscetíveis à infecção por *Candida* spp., e o tratamento com antibacterianos favorece à colonização por *Candida* spp. e seu supercrescimento no intestino do camundongo (SAM et.al., 2017). Em um estudo, o tratamento antibacteriano de longo prazo (76 dias) levou à proliferação expressiva de fungos, alcançando 99% de todos os microrganismos intestinais detectados por análise de sequenciamento de alto rendimento, devido ao desenvolvimento de espécies de *Candida*, que foi o único gênero encontrado nas fezes ao final do tratamento. Da mesma forma, o tratamento prolongado com antibacterianos em seres humanos pode predispor a infecções fúngicas, devido principalmente à proliferação de espécies de *Candida* (WITHERDEN et al., 2017).

De acordo com o conceito de que os fungos também podem influenciar a composição bacteriana da microbiota intestinal, um estudo demonstrou que a restauração da microbiota bacteriana após tratamento com um único antibacteriano foi fortemente influenciada pela colonização por *C. albicans*. Houve diminuição significativa em *Bacteroidetes*, enquanto *Firmicutes* permaneceu inalterado. Todavia, se a perturbação da microbiota induzida por *Candida* é transitória ou a forma como essa levedura interfere no hospedeiro necessita ser melhor elucidada (UNDERHILL E ILIEV, 2014; SAM et.al., 2017; WITHERDEN et al., 2017).

2.4.5.2 Micobiota intestinal e o sistema imune

O conhecimento sobre a interação dos fungos comensais intestinais com o sistema imunológico do hospedeiro é escasso, embora muitos receptores imunes inatos tenham mostrado interagir com patógenos fúngicos (Figura 3). Existem evidências de que o controle de fungos intestinais no hospedeiro é importante, e uma variedade de mecanismos imunes específicos têm sido implicados na depuração de fungos nas superfícies mucosas. Entre esses, surgiram moléculas como a proteína caspase 9 (CARD9) e dectina -1 (CLEC-7A), a interleucina-17 (IL-17) e a IL-22, que são responsáveis pela defesa do hospedeiro contra fungos, e mutações genéticas em cada um dos genes que codificam para estas moléculas está associada com susceptibilidade a infecções fúngicas em seres humanos (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Polimorfismo genético em CLEC7A, o gene que codifica o receptor fúngico Dectina-1, está associado ao agravamento da colite ulcerativa em seres humanos, e observou-se que a colite experimental em camundongos é mais grave na ausência de Dectina-1. A colite mais grave em camundongos foi acompanhada por invasão fúngica da mucosa, bem como uma expansão geral de fungos oportunistas, como espécies de *Candida* spp. e *Trichosporon* spp., associada a uma diminuição de espécies de *Saccharomyces* spp. não patogênicas. Em pacientes com DII, a doença está associada a aumento de espécies de *Candida* spp. (especificamente *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*), sugerindo que a disbiose fúngica pode estar associada a doença. No entanto, o método DGGE utilizado foi limitado para capacidade de caracterizar completamente as populações fúngicas, sendo necessários mais estudos aplicando análises de sequenciamento massivo mais sensíveis (CHU et al., 2018; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Uma deficiência em CARD9, uma molécula de sinalização da Dectina-1 e outras lectinas envolvidas no reconhecimento de fungos, também tem sido associada à suscetibilidade à DII em humanos. Embora CARD9 possa estar envolvida na sinalização por outros receptores, a importância específica na imunidade antifúngica é suportada pela observação de que os indivíduos com mutações no gene para CARD9 são especificamente susceptíveis a infecções fúngicas e nenhum outro tipo de infecção. A deficiência de CARD9 em

camundongos aumenta a susceptibilidade à colite experimental pelo aumento da quantidade de fungos no intestino e também de anticorpos antifúngicos, resultando no agravamento da doença. Além disso, os camundongos podem ser parcialmente recuperados através de tratamento antifúngico, corroborando o papel da imunidade a fungos intestinais na colite (CHU et al., 2018; UNDERHILL E ILIEV, 2014).

A interleucina IL-22, uma citocina semelhante a IL-17, está estreitamente associada à imunidade da mucosa e tem sido implicada no controle de fungos gastrintestinais. Os camundongos sem IL-22 são mais susceptíveis à candidíase gastrintestinal quando infectados intragastricamente com *C. albicans*. Além disso, IL-12 e interferon- γ (IFN- γ) são necessários para a defesa eficaz do hospedeiro. O IFN- γ está relacionado a uma importante contribuição na ativação da imunidade mediada por células T do tipo Th1. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar se mecanismos semelhantes estão envolvidos durante a relação comensal em curso com *C. albicans* no intestino humano. Curiosamente, os modelos de colite em camundongos demonstram que tanto IL-17A como IL-17F são dispensáveis para proteção contra as espécies de *Candida* spp. no trato gastrintestinal (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

Evidências sugerem que as espécies intestinais de *Candida* spp. podem influenciar a imunidade em locais distantes do corpo por interações com células imunes e via produção de metabólitos fúngicos. Foi demonstrado que o crescimento excessivo de espécies de *Candida* spp. no intestino induzido por antibacterianos promove a inflamação pulmonar em modelo murino de alergia. As espécies de *Candida* (bem como muitos outros fungos) produzem diretamente a prostaglandina E2 (PGE2), um imunomodulador potente produzido pelas células imunitárias, a partir do ácido araquidônico do hospedeiro, e foi proposto que a PGE2 produzida por *Candida* poderia estar envolvida na inflamação alérgica. De fato, foi demonstrado que a PGE2 derivada de *Candida* spp. pode atingir os pulmões via corrente sanguínea, atuar sobre os macrófagos pulmonares e promover inflamação alérgica (ILIEV et al., 2017).

Do mesmo modo, uma associação entre a doença do enxerto contra o hospedeiro, complicação comum do transplante de medula óssea, e a colonização intestinal com espécies de *Candida* spp. tem sido observada em pacientes transplantados. A colonização intestinal foi correlacionada com a presença de um

gene codificador de Dectina-1 defeituoso, sugerindo que a regulação mediada por imunidade da colonização pode ter um efeito na tolerância periférica (UNDERHILL E ILIEV, 2014).

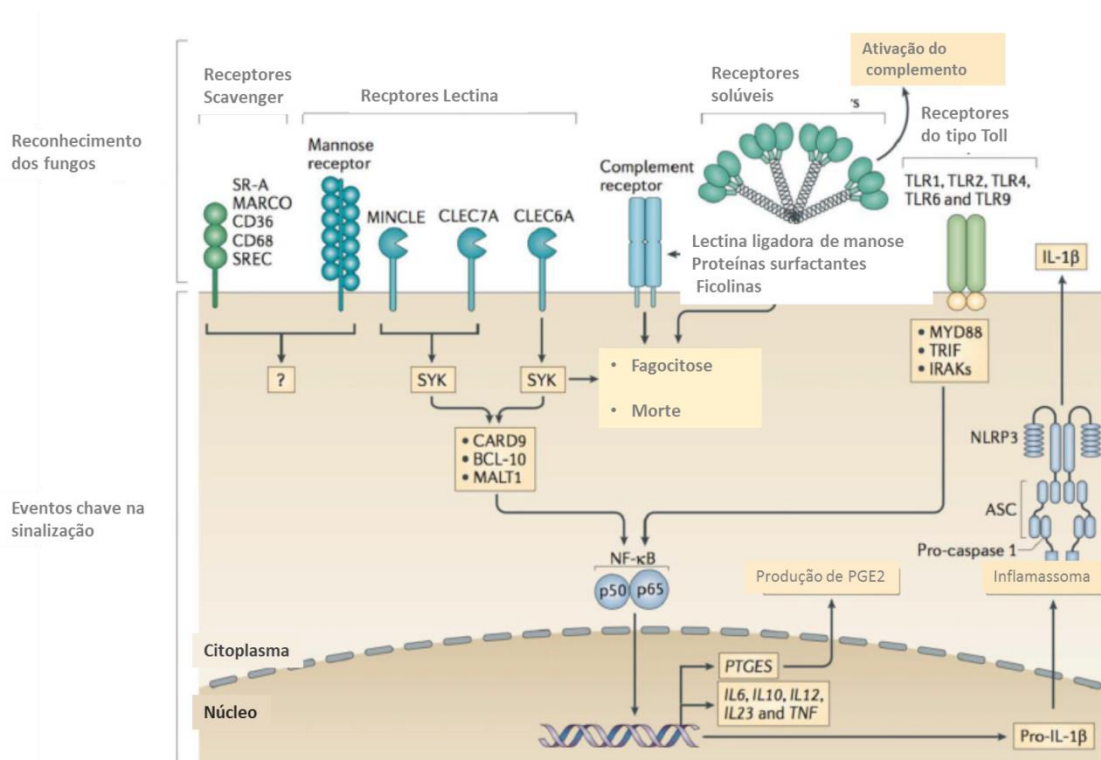


Figura 3. Receptores da resposta imune e vias de sinalização envolvidas no reconhecimento de fungos. Fonte: Adaptado de UNDERHILL E ILIEV (2014).

2.4.5.3 Microbiota intestinal e doenças associadas

A DII é uma desordem inflamatória crônica do trato gastrointestinal (TGI) que inclui a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU). Caracterizada por uma inflamação ilimitada do intestino, que resulta em má absorção de nutrientes, dor abdominal intensa e maior chance de desenvolvimento de câncer colorretal. Apesar das terapias atuais, tais como imunossupressão, ressecções intestinais e uso de antibacterianos para amenizar os sintomas, não há cura para esta doença. As evidências sugerem importante papel da microbiota na modulação da DII (LIMON et al., 2017). A adesão e abundância das comunidades microbianas em pacientes com DII são diferentes daquelas observadas em indivíduos saudáveis. Além disso, o tratamento probiótico durante a colite experimental pode ser uma medida

paliativa para a doença (MUKHERJEE et al., 2015 e CHIARO et al., 2017; CHU et al.,2018).

A microbiota humana é um ecossistema complexo composto por bactérias, fungos, arqueias e vírus. Entretanto, a maioria dos estudos concentrou-se unicamente nos membros bacterianos e no seu envolvimento na DII. Os fungos são organismos grandes e complexos, caracterizados como patógenos oportunistas durante terapia imunomediada e antibacteriana. Existem indicações clínicas e experimentais de que as leveduras possam estar relacionadas ao processo de inflamação intestinal. A primeira evidência foi a descoberta de anticorpos anti - *Saccharomyces cerevisiae* (ASCAs) no soro de pacientes com DC, o que sugere o envolvimento da resposta imunológica a essa levedura na progressão da DII (MUKHERJEE et al., 2015 e CHIARO et al., 2017; CHU et al.,2018).

Para pacientes que sofrem de DII é prescrito antimicrobianos para eliminar bactérias e modular a resposta inflamatória crônica. Como as leveduras não são alvo dos antimicrobianos comumente prescritos, um efeito colateral bem documentado do uso prolongado de antimicrobianos é o supercrescimento de espécies fúngicas. Além disso, as leveduras são um componente comum de muitos alimentos, os quais podem prover uma exposição diária a esses microrganismos. Polimorfismos em genes como CARD9 e CLEC7A (dectina-1) que codificam proteínas que atuam no reconhecimento de fungos pelo sistema imune do hospedeiro foram descritos em pacientes que sofrem de aumento das infecções fúngicas. A deleção destes genes em camundongos leva à piora da doença intestinal. Assim, existem tanto em modelos de camundongos como em humanos, argumentos que suportam o papel dos fungos nas doenças intestinais. Entretanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre permanecem ainda pouco elucidados (CHIARO et al., 2017; CHU et al.,2018).

Os estudos das comunidades de fungos em pacientes com DII relatam uma diminuição da diversidade bacteriana com um aumento concomitante na variedade e quantidade de fungos durante a DII, suportando a hipótese de que aumento na razão fungo/bactéria possa estar associado à doença. Várias espécies de fungos foram identificadas tanto de indivíduos colitogênicos quanto de indivíduos saudáveis, incluindo *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Penicillium italicum*, *Rhodotorula aurantiaca* e *Malassezia sympodialis*. Essas espécies pertencem a dois filos,

Ascomycota e Basidiomycota, que dominam a comunidade fúngica intestinal (MUKHERJEE et al., 2014 e CHIARO et al., 2017; CHU et al., 2018).

A síndrome de Rett (SR), uma doença neurológica progressiva, causada por mutações no gene MeCP2, é comumente associada com disfunções gastrointestinais e constipação, sugerindo uma ligação entre as anormalidades gastrointestinais na SR e a microbiota intestinal. A ocorrência de um estado sub-inflamatório intestinal em indivíduos com a SR é caracterizada pelos valores elevados de calprotectina fecal e velocidade de sedimentação dos eritrócitos. A SR está associada a alterações na abundância relativa da microbiota bacteriana e fúngica intestinal, com menor riqueza microbiana e predomínio dos táxons microbianos dos gêneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Erysipelotrichaceae*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Eggerthella*, *Escherichia*, *Shigella* e pela levedura do gênero *Candida* (ENAUD et al., 2018; STRATI et al., 2016).

As alterações da microbiota intestinal não dependem do estado de constipação observado na SR, e a disbiose da microbiota produz perfis alterados de ácidos graxos de cadeia curta. Demonstrou-se pela primeira vez que a SR está associada a uma disbiose tanto do componente fúngico quanto bacteriano da microbiota intestinal, sugerindo que as deficiências do funcionamento do MeCP2, favorecem o estabelecimento de uma comunidade microbiana adaptada ao nicho gastrointestinal constipado dos indivíduos portadores da síndrome. A produção alterada de ácidos graxos de cadeia curta associada a essa microbiota pode reforçar o estado de constipação dos indivíduos e contribuir para a fisiopatologia gastrointestinal na Síndrome de Rett (ENAUD et al., 2018; STRATI et al., 2016).

A demência é uma categoria abrangente de doenças cerebrais que é grande o suficiente para comprometer as tarefas diárias de uma pessoa. O tipo mais comum de demência é a doença de Alzheimer (DA). Novas pesquisas indicam que a microbiota do trato gastrointestinal está diretamente ligada à patogênese da demência através do desencadeamento de doenças metabólicas e de inflamação de baixo grau progressiva. As leveduras do gênero *Candida* promovem a produção de serotonina, 5 – Hidroxitriptamina (5-HT), a qual além de ser um importante neurotransmissor cerebral também é um importante regulador do trato gastrointestinal, aumentando a motilidade intestinal. Portanto, uma nova estratégia proposta para o tratamento destes distúrbios e como um adjuvante para o

tratamento psiquiátrico da demência e outras doenças relacionadas é através da modulação da microbiota (por exemplo, com o uso de probióticos) (ALKAZIR et al., 2017; ENAUD et al., 2018).

Outra possibilidade é de que a doença de Alzheimer (DA) tenha uma etiologia microbiana, devido a evidências de que o tecido do sistema nervoso central (SNC) de pacientes com DA contém células fúngicas e hifas. O material fúngico pode ser detectado intra e extracelularmente usando anticorpos específicos contra vários fungos. Diferentes regiões cerebrais, incluindo córtex frontal externo, hemisfério cerebelar, hipocampo e plexo coróide contêm material fúngico, que está ausente no tecido cerebral de indivíduos controle. Análise de seções cerebrais de dez pacientes com DA revelou que todos estão infectados com fungos. Infecção fúngica também é observada nos vasos sanguíneos, o que pode explicar a patologia vascular frequentemente detectada em pacientes com DA e a translocação de fungos do trato gastrointestinal para os vasos sanguíneos e posteriormente para o SNC. O sequenciamento do DNA fúngico extraído de amostras do SNC congeladas identificou várias espécies de fungos. Os achados fornecem evidências convincentes para a existência de infecção fúngica no SNC de pacientes com DA, mas não em indivíduos controle (ENAUD et al., 2018; PISA et al., 2015).

A correlação entre infecção devido ao vírus da Hepatite B (VHB) e a composição e diversidade do micobioma gastrointestinal foi investigada em 161 pacientes com cirrose relacionada ao VHB (n = 38), infecção crônica pelo VHB (n = 35), portadores do VHB (n = 33) e voluntários saudáveis (n = 55). Utilizaram-se tanto métodos dependentes de cultura como independentes de cultura (sequenciamento do RNA ribossomal 18S). A abordagem dependente da cultura detectou leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e *S. cerevisiae*. O método independente de cultura identificou 37 unidades taxonômicas operacionais (UTO) representando diferentes fungos, incluindo *Saccharomyces* spp., *Penicillium* spp., *Galactomyces* spp. e *Cryptococcus* spp. O número de fungos detectados foi positivamente correlacionado com a progressão da doença. O aumento de *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. tem correlação direta com o aumento da gravidade da infecção pelo VHB. Além disso, pacientes com cirrose relacionada ao VHB ou

infecção crônica pelo VHB apresentaram maior diversidade de fungos do que os portadores de VHB e voluntários saudáveis. Estes resultados confirmaram achados anteriores quanto à relação entre o aumento dos fungos e a gravidade da doença na infecção pelo VHB (MUKHERJEE et al., 2015).

Uma ligação potencial entre o aumento da abundância fúngica e a infecção pelo VHB poderia ser uma deficiência subjacente na resposta imunitária do hospedeiro. A infecção persistente pelo VHB em pacientes brancos está associada a uma mutação na proteína de ligação à manose. A proteína de ligação à manose é um receptor de reconhecimento de padrões (RRP) que se liga a manose na parede celular dos fungos, desencadeando uma resposta imunitária do hospedeiro e, assim, tem um papel chave na defesa contra patógenos fúngicos. A falta ou disfunção da proteína de ligação à manose durante a infecção pelo VHB poderia conduzir a uma defesa atenuada contra os fungos e resultar em uma colonização aumentada por esses agentes patogênicos (MUKHERJEE et al., 2015).

2.4.6 Microbiota intestinal e obesidade

Embora a relação entre fungos e doenças gastrintestinais seja descrita, a associação entre microbiota e obesidade é recente. Observou-se uma tendência clara na diminuição da diversidade fúngica em indivíduos obesos. O microbioma de indivíduos obesos tem uma maior ocorrência do filo *Ascomycota*, classe *Sacharomycetes* e famílias *Dipodascaceae* e *Saccharomycetaceae*, e uma maior abundância relativa de fungos pertencentes à classe *Tremellomycetes*, em comparação com indivíduos não obesos. Esses achados são consistentes com dados previamente relatados sobre a diversidade bacteriana no estado obeso e são contrários ao aumento observado na diversidade fúngica em pacientes com doença inflamatória intestinal ou hepatite crônica. De um modo geral, essas conclusões indicam que o microbioma intestinal parece estar alterado em pacientes obesos, em associação com alterações no metabolismo lipídico e glicêmico (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Rodríguez e colaboradores (2015), utilizando técnicas de sequenciamento baseadas no espaço interno transcrito (ITS), avaliaram a microbiota fúngica (microbioma) em indivíduos obesos (n= 27) e não obesos (n= 12). Os resultados

demonstraram que os pacientes obesos podem ser discriminados pela sua composição fúngica específica, que também distingue a obesidade metabólica "saudável" da "não saudável". Foi também verificada ligação preliminar a metabólitos, tais como ácido hexadecanodióico, ácido capróico e ácido N-acetil-L-glutâmico. *Mucor racemosus* e *M. fuscus* foram as espécies mais representadas em indivíduos não obesos em comparação com as contrapartes obesas. Curiosamente, a diminuição da abundância relativa do gênero *Mucor* em indivíduos obesos foi reversível após a perda de peso. Coletivamente, esses achados sugerem que a manipulação de comunidades da microbiota intestinal pode ser um novo alvo no tratamento da obesidade (RODRÍGUEZ et al., 2015).

A abundância relativa de alguns fungos foi relacionada à adiposidade e distúrbios metabólicos, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, pressão arterial e atividade inflamatória. Por exemplo, o filo *Ascomycota*, as classes *Sacharomycetes*, *Tremellomycetes* e *Cystobasidiomycetes*, as famílias *Erythrobasidiaceae* e *Dipodascaceae* e os gêneros *Aspergillus*, *Eurotium* e *Rhodotorula* aumentaram com a ocorrência de anormalidades metabólicas. Por outro lado, a abundância relativa de fungos pertencentes ao filo *Zygomycota*, classes *Agaricomycetes* e *Eurotiomycetes*, famílias *Mucoraceae*, *Nectriaceae*, *Ceratocystidaceae*, *Corticaceae*, *Debariomycetaceae* e *Hypocraceae* e os gêneros *Mucor*, *Penicillium*, *Monillia* e *Ceratocystis* foram associados à proteção contra esses distúrbios metabólicos (RODRÍGUEZ et al., 2015).

O achado de que a inflamação sistêmica está associada à obesidade sugere que a composição intestinal bacteriana relacionada aos indivíduos obesos tem efeito pró-inflamatório. Isto é semelhante às observações com *Tremellomycetes*, classe que não foi apenas significativamente mais abundante em indivíduos obesos, mas também apresentou correlação positiva com parâmetros inflamatórios. Alguns metabólitos do gênero *Penicillium* demonstraram atividade pró-inflamatória e de resistência à insulina. Por sinal, a presença de algumas comunidades fúngicas foi associada com obesos metabolicamente saudáveis. Embora a abundância relativa de *Eurotiomycetes* tenha sido semelhante em indivíduos obesos e não obesos, 40% dos obesos apresentaram uma abundância inferior a 1%, associada a perfil metabólico alterado de glicose e lipídios. Além disso, aqueles indivíduos obesos com > 1% de *Eurotiomycetes* apresentavam níveis semelhantes de insulina

em jejum e triglicérides em jejum em comparação com indivíduos não obesos (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Sabe-se que o ácido N-acetil-L-glutâmico é metabolizado por alguns membros do filo *Ascomycota*, ao qual pertencem os *Eurotiomycetes*. Os sais desse ácido demonstraram efeitos natriuréticos, resultando na diminuição da pressão sanguínea. Além disso, demonstrou-se que o ácido hexadecanodióico, associado a uma diminuição da abundância de *Eurotiomycetes*, apresenta atividade antimicótica (RODRÍGUEZ et al., 2015).

As leveduras do gênero *Candida* têm sido identificadas com sucesso a partir do intestino de indivíduos saudáveis. Alguns estudos sugeriram uma ligação entre o aumento de *Candida* spp. e diabetes e distúrbios inflamatórios do trato gastrointestinal, com predominância de *Candida albicans* (RODRÍGUEZ et al., 2015). Em dietas de curto prazo, as leveduras do gênero *Candida* apresentaram correlação positiva com dietas ricas em carboidratos (CHU et al., 2018; HOFFMANN et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017; WITHERDEN et al., 2017;).

O gênero *Mucor* é o mais prevalente em indivíduos não obesos; especificamente, *M. racemosus* e *M. fuscus* são as espécies mais representativas nesses indivíduos. *Mucor* sp. tem uma composição de polissacarídeos de parede celular baseada em quitina-quitosana e têm sido descritos papéis multifuncionais desse polissacarídeo como agente protetor contra a obesidade. *Mucor racemosus* foi descrito como fonte de quitosana. A abundância relativa do gênero *Mucor* aumenta após perda de peso em indivíduos obesos de forma análoga à Bacteroidetes, o que também aumenta após a perda de peso (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Foram identificados três grupamentos diferentes em análises de DDGE. O grupo 1 foi significativamente associado com marcadores de adiposidade e dislipidemia, sugerindo um possível alvo para tratamento. Observou-se que a maior alteração nas populações fúngicas associadas ao grupo 3 reflete mudanças dramáticas semelhantes as comunidades bacterianas (razão Firmicutes/Bacteroidetes) do que nos grupos 1 e 2 (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Análise de interações entre os fungos demonstrou que, em pacientes obesos, o filo de *Ascomycota* correlacionou-se negativamente com *Basidiomycota* e *Zygomycota*. Entre os não obesos, observou-se associação negativa significativa

entre Pichiaceae e Dipodascaceae. A mesma relação antagônica entre *Candida* (Família Dipodascaceae) e *Pichia* spp. (Família Pichiaceae) tem sido observada na microbiota oral de pacientes infectados pelo HIV (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Há conhecimento limitado sobre as interações bactéria-fungo do intestino e seu papel na saúde e na doença. Uma compreensão das interações microbianas entre os domínios Bacteria e Eucarya, especialmente entre o reino Fungi, dentro do contexto da saúde são promissoras para facilitar a descoberta de alvos preventivos e terapêuticos potenciais. Uma análise mais aprofundada das rotas metabólicas envolvendo genomas fúngicos e bacterianos será necessária para desvendar inequivocamente as interações metabólicas entre esses microrganismos (RODRÍGUEZ et al., 2015).

2.5 Métodos de estudo de ecossistemas microbianos intestinais

Ao utilizarem métodos moleculares de investigação, pesquisadores sugeriram que o trato gastrointestinal humano é constituído por uma grande quantidade de microrganismos, em torno 10^{14} bactérias e arqueias por grama de conteúdo luminal, além de fungos, vírus e protozoários. As bactérias pertencem, provavelmente, a mais de 1800 gêneros e de 15.000 a 36.000 espécies, distribuídas de maneira não homogênea, de acordo com as características de cada porção intestinal (VILLELA et al., 2004; BRANDT et al., 2006; MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; MORALES, BRIGNARDELL e GOTTELAND, 2010; WALTER e LEY, 2011).

Estudos são realizados para avaliar a participação das bactérias na microbiota intestinal. Entretanto, a diversidade fúngica desse ecossistema é pouco conhecida (GOUBA, et al., 2015). Isso se deve em parte a utilização de técnicas dependentes de cultivo e caracterização morfológica e fisiológica dos fungos, o que restringe a identificação apenas dos cultiváveis (SCUPHAM et al., 2006).

As técnicas de cultivo básicas de fungos remontam a década de 1920 e consistem na inoculação das amostras em meios de cultura sólidos em placas de Petri ou frascos contendo meios de cultura líquidos estéreis. Os resultados dos experimentos são analisados visualmente, através da avaliação do crescimento

das estruturas fúngicas e também de modificações do meio de cultura devido a sua composição. Os métodos de cultura de fungos têm evoluído muito nas últimas décadas. Entretanto, organismos encontrados em pequenas concentrações ou aqueles que requerem interações com outros organismos não podem ser identificados pelos métodos clássicos de cultivo (CUI et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017).

Assim como as bactérias não cultiváveis, os fungos não cultiváveis compreendem a maior parte do microbioma humano (CUI et al., 2013). Por exemplo, Chen e colaboradores (2011) observaram somente dois fungos, obtidos por métodos de cultura: *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* spp., de um total de 37 fungos intestinais relatados, que possuem correlação direta com a hepatite B crônica (CHEN, 2011).

As limitações dos métodos dependentes de cultivo levaram nos últimos vinte anos à introdução de abordagens independentes de cultivo. Assim, novas metodologias para a classificação dos fungos que não requerem cultivo foram desenvolvidas, tais como análises de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP), impressão digital de fragmentos de DNA codificador para RNAr (OFRG), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e hibridização *in situ* (CUI et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017).

O sequenciamento direto dos genes dos fungos tem-se mostrado o melhor método para caracterização do microbioma. Além disso, o desenvolvimento de novas plataformas de sequenciamento (454 Roche, Illumina, HiSeq e MiSeq, Ion Torrent) tem apresentado uma melhor relação custo – benefício quando comparada à metodologia clássica de Sanger (CUI et al., 2013).

A seleção de regiões genômicas alvos é uma técnica comum para estudo de diversidade fúngica, assim como ocorre para os estudos de diversidade bacteriana do microbioma. O gene RNA ribossomal é a região alvo mais comumente utilizada, visando principalmente a subunidade menor 18S do DNAr, a subunidade maior 28S do DNAr e a região dos espaçadores internos transcritos (ITS) (Figura 4). Entretanto, o RNA 28S vem sendo gradualmente eliminado como região alvo, devido à ausência de diferenciação para muitas espécies fúngicas (CUI et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017).

Até o momento, não existe consenso de qual seria a melhor região alvo, 18S ou ITS. Comparada com a região alvo 18S, a ITS é mais diversificada permitindo melhor classificação filogenética (identificação de gêneros). Entretanto, a alta conservação da região 18S, facilita a amplificação do DNAr fúngico. A escolha de qual região dentro da região alvo ITS deve ser criteriosa, pois iniciadores ITS-1 e ITS-1F devem ser utilizados para amplificação do filo *Basidiomycota* e iniciadores ITS-2 e ITS-4 para amplificação do filo *Ascomycota* (CUI et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017).

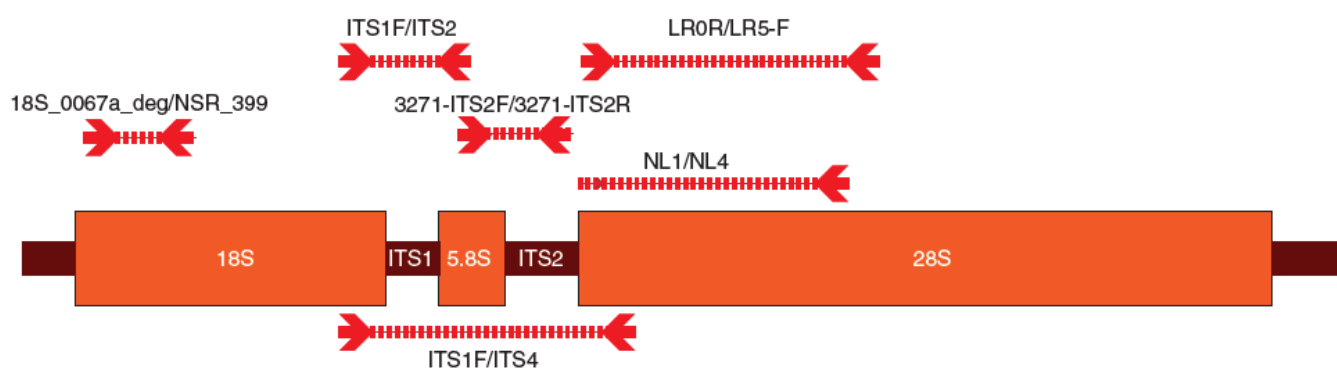


Figura 4. Representação esquemática do DNAr. Fonte: CUI et al. (2013)

Existem poucos relatos da presença de organismos eucariotos na microbiota intestinal que reflitam a abundância ou diversidade de fungos entéricos (SCUPHAM et al., 2006; GOUBA, et al., 2015). Um dos primeiros estudos a avaliar a microbiota intestinal utilizou ratos como modelo. Os principais filos de fungos descritos foram *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chritidiomycota* e *Zigomycota*. Os gêneros detectados foram *Acremonium*, *Monilia*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Scleroderma*, *Catenomyces*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*, *Powellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium* e a ordem *Mucorales* (SCUPHAM et al., 2006).

Recentemente, um estudo revelou a diversidade de fungos leveduriformes, filamentosos e também organismos protistas na microbiota intestinal. Foram avaliadas fezes de sete indivíduos de quatro países tropicais, dentre eles o Brasil. Foram identificadas 38 espécies de fungos por técnicas de cultivo e técnicas moleculares. Os fungos *Malassezia* sp., *Trichosporon* sp., e *Candida* sp. foram encontrados em todas as amostras analisadas, sugerindo distribuição mundial

dessas leveduras, mas outros estudos são necessários para caracterização completa desse microbioma (GOUBA, et al., 2015).

Em outra abordagem, a avaliação de amostras de fezes de 10 indivíduos saudáveis, por meio de técnicas moleculares, revelou a presença dos seguintes fungos: *Wallemia*, *Trichocomaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Rhodotorula*, *Pleosporaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Ascomycota*, *Amphisphaeriaceae* e *Agaricaceae* (DOLLIVE et al., 2012).

O estudo da microbiota permanece relativamente inexplorado devido à falta de bases de dados disponíveis quando comparadas com as do microbioma bacteriano. Estudos de sequenciamento massivo de alto rendimento das regiões ITS é o padrão para análise de diversidade fúngica. No entanto, os resultados são frequentemente tendenciosos, devido à grande variedade de comprimentos de sequência nas regiões ITS e à complexidade das tecnologias de sequenciamento. Em um estudo, foi construída uma acurada base de dados ITS, ntF-ITS1 e essa base de dados poderia ser utilizada para identificação de fungos de comunidades microbianas. A eficácia das estratégias para a análise do microbioma foi avaliada usando essa base de dados para caracterização de comunidade de fungos composta por 26 espécies de 15 gêneros pelo sequenciamento da região ITS1 com três plataformas HTS: Illumina MiSeq (MiSeq), Ion Torrent Personal Genome Machine (IonPGM) e Pacific Biosciences (PacBio) (MOTOOKA et al., 2017).

A avaliação demonstrou que o sequenciamento circular de concordância de PacBio com mais de 8 passagens completas reconstruiu com maior precisão a composição da comunidade simulada. O uso dessa estratégia para análise de sequenciamento profundo da microbiota intestinal em indivíduos japoneses saudáveis revelou dois tipos principais de microbiota: um tipo de uma única espécie composta de *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae* e um tipo multi-espécies. Nesse estudo, foram propostas as melhores estratégias de processamento possível para as três plataformas de sequenciamento, das quais, a plataforma PacBio permitiu a estimativa mais precisa da comunidade fúngica, fornecendo assim um banco de dados e metodologias eficazes para o campo emergente de estudos de microbiomas (MOTOOKA et al., 2017).

Diante do exposto e considerando-se a importância da obesidade nos dias de hoje, caracterizada como uma doença pandêmica pela Organização Mundial da

Saúde, o viés metodológico encontrado em estudo anterior sobre o envolvimento da microbiota intestinal na obesidade, o universo amostral pequeno e, portanto, pouco representativo, a carência de dados regionais/nacionais, sócio-demográficos, de comportamento e clínicos associados aos achados microbiológicos no estudo da obesidade, foi proposto este estudo. Espera-se que com uma amostragem mais representativa e a utilização de diferentes abordagens metodológicas dependentes e independentes de cultivo, seja possível avaliar a diversidade fúngica intestinal em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos, para uma melhor associação entre microbiota, obesidade e características sociais e de comportamento, clínicas e nutricionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar comparativamente a estrutura da microbiota cultivável no trato gastrointestinal humano de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos, e sua estrutura em termos qualitativos e quantitativos, a partir de métodos independentes de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil sociodemográfico e características bioquímicas e nutricionais de indivíduos recrutados na comunidade e caracterizados como obesos, com sobrepeso e eutróficos;
- Isolar em cultura aeróbica, caracterizar e identificar fungos representativos da microbiota intestinal a partir de amostras fecais dos indivíduos recrutados;
- Avaliar a estrutura da comunidade fúngica intestinal dos indivíduos recrutados a partir de DNA metagenômico representativo obtido das amostras fecais pela técnica da reação em cadeia da polimerase e separação de amplicons em eletroforese com gradiente desnaturante (PCR-DGGE);
- Avaliar quantitativamente a distribuição de fungos totais, leveduras e *Candida albicans* na microbiota intestinal dos indivíduos recrutados pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) a partir dos espécimes fecais;
- Determinar a carga microbiana de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota e o número de cópias de DNA de fungos a partir do DNA metagenômico representativo obtido das amostras fecais dos indivíduos recrutados pela técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR);

- Correlacionar a estrutura da comunidade fúngica intestinal avaliada com os perfis bioquímicos e nutricionais dos indivíduos obesos com sobrepeso e eutróficos recrutados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Este é um estudo transversal, prospectivo e de caso controle que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer número 479.002/2013 (Anexo A), no qual foram recrutados 72 indivíduos adultos, assistidos no serviço de nutrição do hospital universitário HU-Cas/UFJF na cidade de Juiz de Fora, MG e na comunidade. Foram selecionados participantes com idade entre 18 e 60 anos, sem histórico de doenças intestinais, diabetes, uso de drogas antimicrobianas no último mês e não submetidos a intervenção nutricional, uma vez que eram pacientes de primeira consulta no serviço de nutrição. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, os participantes foram submetidos à avaliação antropométrica, de consumo alimentar e coleta de espécimes clínicos (sangue periférico e fezes). Foi calculado o Índice de Massa Corporal dos participantes (IMC) de acordo com a Organização Mundial de Saúde (1998), e estes foram classificados em três grupos: eutróficos, com sobrepeso e obesos.

4.2 Avaliação antropométrica e do consumo alimentar

Foi aplicado um questionário desenvolvido pelos pesquisadores para traçar o perfil sociodemográfico e clínico dos participantes (Anexo C) e um questionário de frequência alimentar validado para avaliação de indivíduos obesos (QFA) (Anexo D) foi preenchido com o auxílio de um estudante do curso de graduação em nutrição da UFJF, previamente treinado, a fim de se traçar o perfil alimentar e nutricional dos participantes. Foram utilizados como indicadores de avaliação antropométrica, o peso no momento da entrevista (Kg), altura (cm), Índice de Massa Corporal (IMC) e circunferência da cintura (Anexo D). O peso (Kg) foi aferido uma única vez, utilizando-se balança digital. A altura (cm) foi aferida duas vezes, com o auxílio de um estadiômetro. Os pontos de corte selecionados para

análise da variável IMC foram: baixo peso ($IMC < 18,5 \text{ Kg/m}^2$), eutrofia ($18,5 \text{ Kg/m}^2 < IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$), sobrepeso ($25 \text{ Kg/m}^2 < IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$) e obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) (WHO, 1995). A aferição da circunferência da cintura foi realizada com uma fita métrica inelástica, posicionada na menor curvatura localizada entre as costelas e a crista ilíaca, sendo utilizados como pontos de corte valores $> 80 \text{ cm}$ para mulheres e $> 94 \text{ cm}$ para homens, pois o acúmulo de gordura na região central (obesidade androide) está associada a maior risco relativo no desenvolvimento de comorbidades (OMS,1995).

4.3 Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos como glicemia, insulina, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL e hemograma foram avaliados pelo Laboratório Côrtes Villela, em Juiz de Fora - MG, laboratório de grande porte da cidade, acreditado pelo PALC (Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos) da SBPC/ML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial), após coleta de sangue periférico *in situ*, dentro de convênio estabelecido para a realização deste estudo, sem custo para os participantes. As análises clínicas seguiram os padrões e metodologias estabelecidas na rotina do laboratório com utilização de equipamentos automatizados calibrados e de padrões de referência. Os resultados foram enviados para os pesquisadores e disponibilizados também para os participantes do estudo.

4.4 Coleta de amostras fecais e preparação para análises microbiológicas

As amostras fecais foram coletadas em coletor universal fornecido aos participantes, após os mesmos receberem instruções orais e escritas (via panfleto explicativo) e enviadas ao Centro de Estudos em Microbiologia do ICB/UFJF no prazo máximo de 60 minutos. Após entrada no laboratório, o material foi codificado e processado imediatamente para a realização da cultura e conservado sob diversas condições como descrito a seguir.

4.4.1 Preparo das amostras para isolamento e quantificação dos fungos

As amostras fecais foram homogeneizadas e alíquotas de 1000 mg foram submetidas a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} em solução salina esterilizada (NaCl 0,9%). As amostras diluídas foram plaqueadas (0,1 mL) em Ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil), em triplicata para cada diluição, para cultivo seletivo e quantitativo dos fungos. As placas foram incubadas à 28°C em aerobiose por até 7 dias, com inspeção visual diária para acompanhamento do crescimento dos fungos. As leveduras e fungos filamentosos foram isolados para posterior identificação e a quantificação foi realizada contando-se unidades formadoras de colônia (UFC). A confirmação da identificação dos fungos mais prevalentes foi feita por sequenciamento. Todos os isolados foram verificados para garantir a ausência de contaminação, conservados em água destilada esterilizada e depositados em uma micoteca de fungos intestinais humanos.

4.4.2 Preparo das amostras para realização da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

As amostras fecais foram homogeneizadas e pesadas na quantidade de 150 mg em microtubos de 2,0 mL devidamente esterilizados. Acrescentou-se às amostras 1,5 mL de solução de paraformaldeído 2% (proporção de 1:10 M/V). As amostras foram armazenadas a 4°C até a realização da técnica.

4.4.3 Preparo das amostras para extração de DNA

As amostras fecais foram homogeneizadas e pesadas na quantidade de 200 mg em microtubos de 2,0 mL devidamente esterilizados e congeladas a -20°C até a realização das extrações.

4.5 Identificação dos fungos

As culturas de fungos foram caracterizadas como leveduras ou fungos filamentosos através da avaliação descritiva das características macromorfológicas do verso e reverso das colônias, tais como, aspecto da superfície, características das bordas, cor e presença de pigmentos, através da utilização de ficha de descrição das características macromorfológicas (Apêndice A).

4.5.1 Identificação dos fungos filamentosos

Para os isolados de fungos filamentosos foi utilizada a técnica de microcultivo para identificação dos fungos. Foi utilizado o meio Ágar Batata (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) para semeadura dos fungos e as placas foram incubadas em aerobiose por 7 a 15 dias. Posteriormente, as lâminas foram preparadas com o corante Lactofenol de Aman e visualizadas ao microscópio (Olympus) no aumento de 40X para observação das hifas e estruturas reprodutivas.

4.5.2 Identificação das leveduras

As amostras de leveduras foram identificadas pela técnica de Ionização e Dessorção a laser assistida por matriz acoplada a analisador do tipo espectro de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) e testes de assimilação de carbono (Auxanograma) para confirmação ou quando não havia padrões de referência disponíveis para identificação no MALDI-TOF MS.

Para a identificação das leveduras pela técnica de MALDI-TOF MS, as amostras foram subcultivadas em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) à $35,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ por 48h, com a finalidade de se obter culturas novas. A extração de proteínas foi realizada utilizando ácido fórmico (AF)/etanol (EtOH), de acordo com o protocolo Bruker Daltonics GmbH. O volume ótimo de AF utilizado variou entre 30 e 50 μL , e um volume igual de acetonitrila (ACN) foi adicionado posteriormente. Um microlitro do extrato de proteína bruta foi pipetado em duplicata em uma placa de aço polido

com 96 poços (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e 1mL de solução padrão de bactéria e levedura de referência (Bruker Daltonics) foi utilizado como controle positivo. Linhagens de referência de *Candida albicans* (INCQS 40175) e *Candida krusei* (INCQS 40147) foram utilizadas como controle positivo para leveduras. Após secagem ao ar, todos os poços foram cobertos com a solução matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (ACHC), preparada de acordo com o protocolo do fabricante, e após a secagem, foram analisados em ensaios automatizados operados por FlexControl versão 3.3.108.0 (Bruker Daltonics). As linhagens padrão e as leveduras isoladas foram identificadas pelo software MALDI-TOF MS Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics) (KOLECKA et al., 2013; CROXATTO et al., 2012).

Os espectros de identificação foram gerados com 240 disparos de laser para cada duplicata, os quais foram então comparados com os principais dados dos espectros de massa de referência selecionados a partir do banco de dados Bruker Daltonics (BDAL) e a biblioteca CBS-KNAW (Figura 5) (KOLECKA et al., 2013; CROXATTO et al., 2012).

Subsequentemente, os resultados obtidos pelo MALDI-TOF MS foram pontuados como valores de log de acordo com as orientações do fabricante e foram classificados como: segurança de gênero e identificação de espécie, > 2,0; garantia de identificação de gênero, 1,7-2,0; identificação não confiável (INC), < 1,7. Os espectros de massa obtidos para identificação durante as medições foram visualizados por Bruker Flex Analysis software versão 3.3.75.0 e investigado por ClinProTools versão 3.0 do software Bruker Daltonics. A identificação foi considerada confiável se pelo menos um ponto das duplicatas obteve pontuação maior ou igual a 1,7 (KOLECKA et al., 2013; CROXATTO et al., 2012).

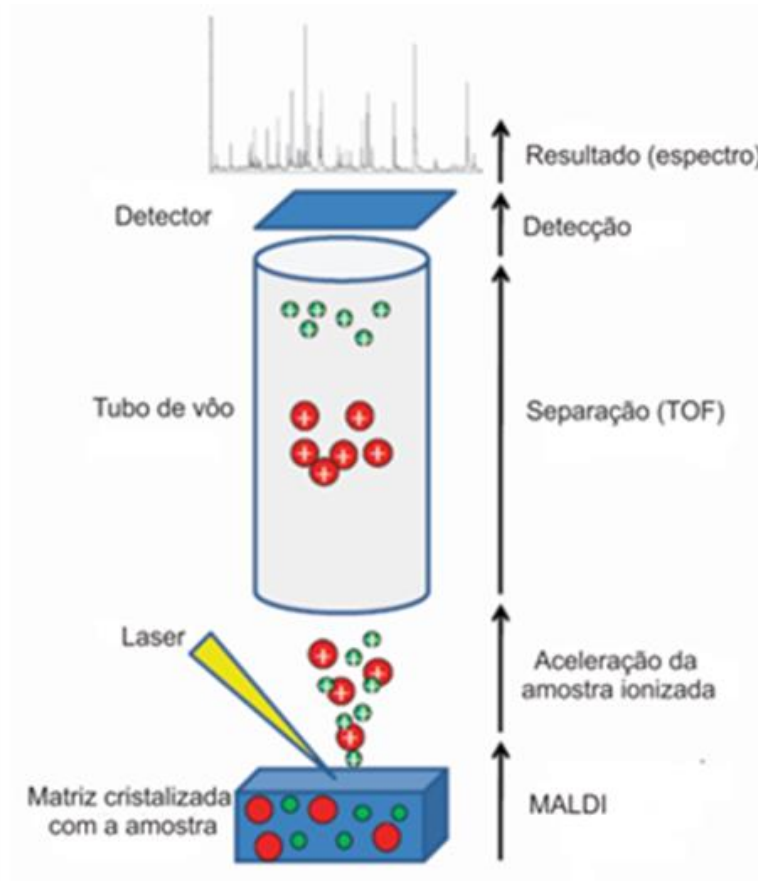


Figura 5. Representação do funcionamento do MALDI-TOF MS. Fonte: SOUZA e SCARCELLI (2000).

4.5.3 Identificação molecular dos fungos isolados

DNA dos fungos mais prevalentes foi extraído utilizando o kit Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals, Illkirch, França). A amplificação por PCR tendo como o alvo o marcador DNAr 18S foi realizada utilizando o oligonucleotídeo iniciador universal para fungos FungiQuant-F: 5'-GGRAAACTCACCAGGTCCAG-3' e FungiQuant-R: 5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3'. Os ciclos de PCR foram compostos por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 min seguida por 50 ciclos de amplificação de 95°C por 30s, 58°C por 30s e 72°C por 30s, e uma extensão final a 72°C por 5 min (LIU et al., 2012). Os amplicons foram purificados utilizando o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). O fragmento de DNA obtido foi sequenciado e comparado contra o banco de dados de nucleotídeos do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI).

4.6 Extração de DNA a partir dos espécimes fecais

O DNA metagenômico foi extraído usando o kit *QIAamp™ DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), com o auxílio do equipamento *QIAcube* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria usando *Qubit®* (Thermo-Fisher). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl-Borato-EDTA). Os extratos de DNA foram armazenados em freezer à -80°C.

4.7 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) foi utilizada para a identificação e quantificação de fungos totais e grupos de fungos presente nas amostras fecais dos indivíduos estudados. Três sondas de oligonucleotídeos específicos ao rRNA 18S dos diferentes grupos pesquisados e uma sonda controle negativa (*Operon Technologies Inc.* Alameda, CA, USA), marcadas com o fluoróforo Cy3 foram utilizadas nesse estudo (Tabela 1).

A partir das amostras fixadas previamente com paraformaldeído 2%, foram adicionados 1100 µL de TWEEN 0,001%, e incubadas a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente, as amostras foram sonicadas (Sonicador Vibra Cell VCX 130PB), imersas em gelo, a uma amplitude de 90% por 3 vezes com pulsos de duração de 60 segundos e vórtex de 60 segundos entre cada pulso.

4.7.1 Técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para análise das leveduras

Após sonicadas, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado em tubo do tipo Falcon de 50 mL e lavado duas vezes com 5 mL de água destilada, sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de policarbonato de 25 mm de diâmetro, 0,2 µm de poro (Whatman GE Healthcare, Maidstone, Reino Unido).

A câmara de hibridização foi preparada com um lenço de papel no fundo de um tubo tipo falcon de 50 mL e saturado com 1 mL de solução de hibridização. Foram adicionados 20 µL de cada sonda em uma lâmina coberta com parafilme junto com o filtro e mais 20 µL de cada sonda foram colocados no papel de filtro. A lâmina foi colocada na câmara de hibridização e incubada a 42°C por 16 h.

Para a lavagem dos filtros após a hibridização foi adicionado 1mL da solução de lavagem correspondente a concentração da sonda. Posteriormente, os filtros foram colocados a 48°C durante 15 minutos, corados durante 3 minutos com 30 µL de DAPI e lavados 3 vezes com etanol 80%.

A contagem das leveduras foi realizada utilizando o microscópio *Olympus BX60* equipado com os filtros DAPI 31000 e Cy3 41007a (*Chroma, Bellows Falls, VT, USA*), respectivamente. Foi fotografado um campo por lâmina para analisar a área correspondente ocupada pelas leveduras e *C. albicans*. O número final de fungos totais foi calculado levando-se em consideração a área ocupada.

4.7.2 Técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para análise dos fungos totais

Após a sonicação das amostras, de acordo com o procedimento descrito no item 4.7, foram adicionados 10 mL de água destilada e centrifugado por 5 minutos a 500 rpm por duas vezes. Após, foi adicionado o sobrenadante coletado das duas centrifugações e centrifugado novamente a 13000 rpm por 10 minutos. Com o precipitado resultante desta centrifugação, foi preparado um esfregaço em lâmina.

A hibridização foi realizada em lâmina utilizando 50 µL da sonda (2,5 µg/ µL) para fungos totais (FUN 1429) e a lâmina recoberta com lamínula. A lâmina contendo o esfregaço da amostra foi colocada na câmara de incubação corresponde (tabela 6) e incubada em estufa à 42,0 ± 2,0 °C por 16 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a lavagem das lâminas com a solução de lavagem correspondente (tabela 1) e colocada a lamínula para recobrir a lâmina, a qual foi incubada em estufa à 48,0 ± 2,0 °C por 15 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e após a secagem das mesmas, foi adicionado uma gota de glicerol com PBS e as lâminas foram recobertas com lamínula.

As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio *Olympus BX60* equipado com o filtro Cy3 41007a (Chroma, Bellows Falls, USA), e um campo por lâmina foi fotografado para analisar a área correspondente ocupada pelos fungos filamentosos e leveduras. O número final de fungos totais foi calculado levando-se em consideração a área ocupada.

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

Sonda	Táxon	Sequência (5'-3')	Formamida*	Referência
FUN 1429	Universal fungos	GTGATGTACTCGCTGGCC	35%	Ott et al., 2007
PF2	Universal leveduras	CTCTGGCTTCACCCTATTC	30%	Scuphan et al., 2005
Caal	<i>Candida albicans</i>	GCCAAGGCTTATACTCGCT	30%	Hogardt et al., 2000

4.8 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada para determinar a quantidade de fungos dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, fungos anaeróbios e fungos totais. As análises quantitativas foram realizadas no termociclador *Rotor-Gene Q* (QIAGEN), utilizando o *Rotor-Gene Syber Green PCR Master Mix* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, conforme instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicata e padronizadas na concentração de 20 ng/µL.

Para a amplificação do DNAr 18S dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, fungos anaeróbios e fungos totais, oligonucleotídeos iniciadores específicos foram utilizados (Tabela 2). A qPCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos e anelamento a 60°C por 30 segundos. A curva padrão para os fungos foi construída a partir de diluições seriadas ($10^6 - 10^1$ cópias/µL) do DNA genômico de *Candida albicans* INCQS 40175 e utilizada para determinação da concentração dos fungos em cópias de DNA/µL das amostras. Foi realizada a

quantificação absoluta dos fungos totais das amostras através da utilização da curva padrão e a quantificação relativa dos filos Ascomycota e Basidiomycota através da utilização do método algoritmo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR.

Oligos	Sequência (5' – 3')	Referência
FungiQuant F	GGRAAACTCACCAGGTCCAG	Liu et al., 2012
FungiQuant R	GSWCTATCCCCAKCACGA	Liu et al., 2012
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	Xu et al., 2014
ITS4Asco	CGTTACTRRGGCAATCCCTGTTG	Xu et al., 2014
NL1F	ATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Xu et al., 2014
ITS4B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Xu et al., 2014

4.9 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O perfil genético das diferentes populações de fungos presentes nas amostras fecais foi avaliado pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante.

4.9.1 Amplificação de DNAr 18S de representantes do Reino *Fungi* utilizando oligoiniciadores específicos

Fragmentos do gene codificador dos RNAr 18S de grupos microbianos específicos representantes do Reino *Fungi* foram amplificados por PCR. O molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA total dos fungos extraído das amostras de fezes.

Para amplificar a região dos genes DNAr 18S do Reino *Fungi* e avaliar as possíveis diferenças entre as amostras foi utilizada a técnica de Nested-PCR com os pares de oligonucleotídeos iniciadores NS1 (5'-GTAGTCATATGTCTG-3') /FR1 (5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3') e FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') / GC-

FR1 (5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3') (VAINIO e HANTULA, 2000). Essa técnica consiste na realização de uma primeira reação de amplificação seguida de uma posterior amplificação utilizando como DNA molde os amplicons da primeira reação. As reações de PCR continham aproximadamente 20 ng/μL de DNA total, 1,25 μL de cada primer (10 μM) e como reagente foi utilizado o PCR Master Mix® (Promega, Madison, EUA), que contém Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida por 30 ciclos a 95°C por 15 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para anelamento dos oligoiniciadores e 68°C por 1,5 minutos para o primeiro par de oligoiniciadores (NS1/FR1) e 68°C por 30 segundos para o segundo par de oligoiniciadores (FF390/GC-FR1) para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 68°C por 5 minutos (VAINIO e HANTULA, 2000).

Foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Techne® TC-412. Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose (Sigma, Madri, Espanha) 1,2% em TBE (Tris-base, ácido bórico e EDTA), e corados com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de *100bp plus DNA ladder ready-to-use* (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) para estimativa dos tamanhos dos amplicons.

4.9.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Foram aplicados 20 μL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 25% a 52,5% para a análise dos fragmentos e foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 *Gradient Delivery System* – BIO-Rad, Califórnia, USA), uma com 25% e a outra com 52,5% dos agentes desnaturantes {uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v)}. Além das soluções estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-

tetrametiletileno diamino) (catalisador) e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X) para visualização do gradiente (LI et al., 2012).

A eletroforese foi realizada em temperatura de 60°C e voltagem constante de 120V, durante 7,5 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBER® Gold (Invitrogen, Burlington, Canadá), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no transluminador ultravioleta ImageQuant 100 (GE Healthcar) e capturada com o auxílio da câmera ED LENS SP-500 UZ (Olympus).

4.10 Análises Estatísticas

Para análise dos resultados quantitativos obtidos, foram utilizadas as ferramentas estatísticas SPSS versão 20.0, XLSTAT 2017 e PAST 3.0. Os dados obtidos foram avaliados quanto o tipo de distribuição, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk e quanto a presença de outliers pelo Teste de Grubs. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes paramétricos t Student (análises univariadas) e Bartlett (análises multivariadas). Para os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon (análises univariadas) e de Kruskal Wallis e Teste de Bonferroni (análises multivariadas).

Para as análises de correlação foram utilizados os Testes de correlação de Spearman, Análise de Correlação Canônica (CCA) e Análise de Componente Principal (PCA). Valores de p menores que 5 % ($p < 0,05$) foram considerados significativos. O coeficiente de correlação pode variar em termos de valor de -1 a +1. Quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis. Um valor absoluto de 1 indica uma relação linear perfeita. A correlação perto de 0 indica que não há relação linear entre as variáveis. O sinal de cada coeficiente indica a direção da relação. Se ambas as variáveis tendem a aumentar ou diminuir em conjunto, o coeficiente é positivo. Se uma variável tende a aumentar à medida que as outras diminuem, o coeficiente é negativo.

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis de DGGE foi realizada utilizando o programa *Bionumerics* 7.1. A estrutura da comunidade fúngica foi avaliada com base no coeficiente “Dice” de similaridade e no método de

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos. Análise de Correlação Canônica (CCA) também foi realizada para avaliar o grau de similaridade entre as amostras. Os dados obtidos com o auxílio do programa *Bionumerics* 7.1 foram utilizados para calcular a riqueza com o auxílio do programa *PAST* 3.0. A variável riqueza foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (OTU) foi codificada como “1” e ausência como “0”. Para a análise dos resultados de riqueza as médias dos grupos foram avaliadas pelo índice de Margalef.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil sociodemográfico, antropométrico e bioquímico dos participantes

As características sociodemográficas dos 72 voluntários avaliados neste estudo estão apresentadas na tabela 3. A média de idade dos participantes foi de 39,61 anos e indivíduos do sexo feminino predominaram nos grupos eutrófico e obeso. Os dados antropométricos foram utilizados para classificação dos indivíduos nos três grupos avaliados: eutrófico, sobrepeso e obeso. Houve um aumento gradual das medidas de circunferência abdominal, cintura e quadril, relação cintura-quadril e índice de massa corporal (IMC) de acordo com os grupos de indivíduos avaliados, sendo o aumento observado de eutróficos para obesos. Apesar de todas as diferenças nas medidas antropométricas serem de significância estatística entre indivíduos eutróficos e obesos, foi notoriamente heterogênea as diferenças estatísticas nos voluntários do sexo feminino entre os três grupos avaliados ($p < 0,05$). Porém, não foram observadas diferenças significativas nas medidas antropométricas entre os indivíduos do sexo masculino dos grupos eutrófico e sobrepeso. Entretanto, nos indivíduos do sexo masculino do grupo sobrepeso, foram observados aumento nos valores das medidas antropométricas.

Foram avaliadas também as variáveis estado civil, cor da pele autodeclarada, renda mensal, e escolaridade dos pacientes (tabela 4). Os dados demonstraram que 80% dos participantes classificados como obesos possuíam uma renda familiar mensal entre 1 e 3 salários mínimos, sendo, portanto, classificados nas classes sociais D e E, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), sendo a maioria desses indivíduos do sexo feminino.

Tabela 3. Características antropométricas dos participantes do estudo.

Parâmetros	Grupo de indivíduos			<i>p</i> < 0,05*	
	Eutrófico (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n= 24)		
Sexo (masculino/feminino)	5/19	12/12	9/15		
Média idade (anos ± DP)	37,91 ± 12	38,12 ± 13,38	42,79 ± 11,67		
Média IMC (média ± DP)	22,82 ± 1,77	27,01±1,34	36,98 ± 6,04	<i>a,b,c</i>	
Circunferência abdominal (média ± DP)	Masculino	93,80±9,80	94,75±4,12	111,22±16,63	<i>b,c</i>
	Feminino	82,29±5,00	94,63±5,87	118,73±14,10	<i>a,b,c</i>
Circunferência cintura (média ± DP)	Masculino	87,00±9,19	91,00±4,12	110,66±17,38	<i>b,c</i>
	Feminino	74,92±4,34	86,42±4,93	113,33±15,79	<i>a,b,c</i>
Circunferência quadril (média ± DP)	Masculino	100,00±4,12	104,91±3,87	110,77±4,32	<i>b,c</i>
	Feminino	99,21±4,83	105,91±4,67	124,13±13,04	<i>a,b,c</i>
Razão cintura/quadril (média ± DP)	Masculino	0,87±0,70	0,87±0,55	1,00±0,16	<i>b, c</i>
	Feminino	0,75±0,40	0,81±0,50	0,93±0,08	<i>a,b,c</i>

* Análises estatísticas significativas: a – comparação entre os valores dos participantes eutróficos e com sobrepeso; b - comparação entre os valores dos participantes obesos e com sobrepeso; c - comparação entre os valores dos participantes eutróficos e obesos.

Tabela 4. Características sociodemográficas dos participantes do estudo.

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

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

As características clínicas avaliadas foram apresentadas na tabela 5, e os dados laboratoriais na tabela 6. Os participantes obesos foram os que mais relataram sofrer de alteração na pressão arterial (62%) quando comparados aos indivíduos com sobrepeso (12%) e eutrófico (4%). Foi observada diferença

estatística significativa entre os valores médios dos parâmetros glicose sérica e insulina basal dos grupos eutrófico e sobrepeso, embora estejam dentro dos valores de referência. Os indivíduos obesos apresentaram uma maior concentração sérica de glicose (11%) e insulina (124%) do que os eutróficos.

Tabela 5. Características clínicas e comportamentais dos participantes do estudo.

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

Tabela 6. Dados laboratoriais dos participantes do estudo.

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

^aValores de referência segundo BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008. ^bValores de *P* para o teste de Kolmogorov-Smirnov. ^cvalores de *P* para teste T de student

*Valores de Referência de Homa-IR: IMC até 25 = 0,4- 2,9; IMC 25-30 = 0,4- 4,3; IMC > 30 = 0,7- 8,2; **Valores de referência de HOMA-β expresso em porcentagem, tendo como referencial 100%.

5.2 Avaliação da composição nutricional da dieta dos participantes

Foi avaliado o consumo de calorias, macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídeos) e fibras, relativo aos últimos seis meses, através da aplicação do questionário de frequência alimentar (QFA).

A ingestão de calorias e carboidratos foi maior no grupo de obesos quando comparado ao grupo dos eutróficos. O grupo de indivíduos com sobrepeso mostrou um consumo intermediário de calorias (Figuras 6 e 7).

Não houve diferença no consumo de lipídeos e proteínas entre os grupos, e o grupo de indivíduos obesos mostrou um maior consumo de fibras em relação ao grupo eutrófico. O grupo com sobrepeso mostrou um consumo intermediário destes nutrientes (Figuras 7).

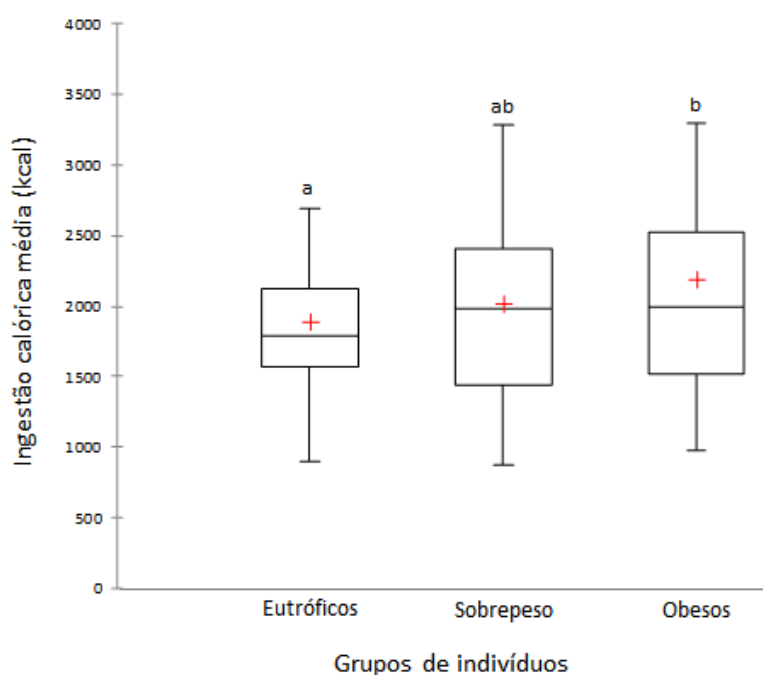


Figura 6. Ingestão calórica dos participantes do estudo. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

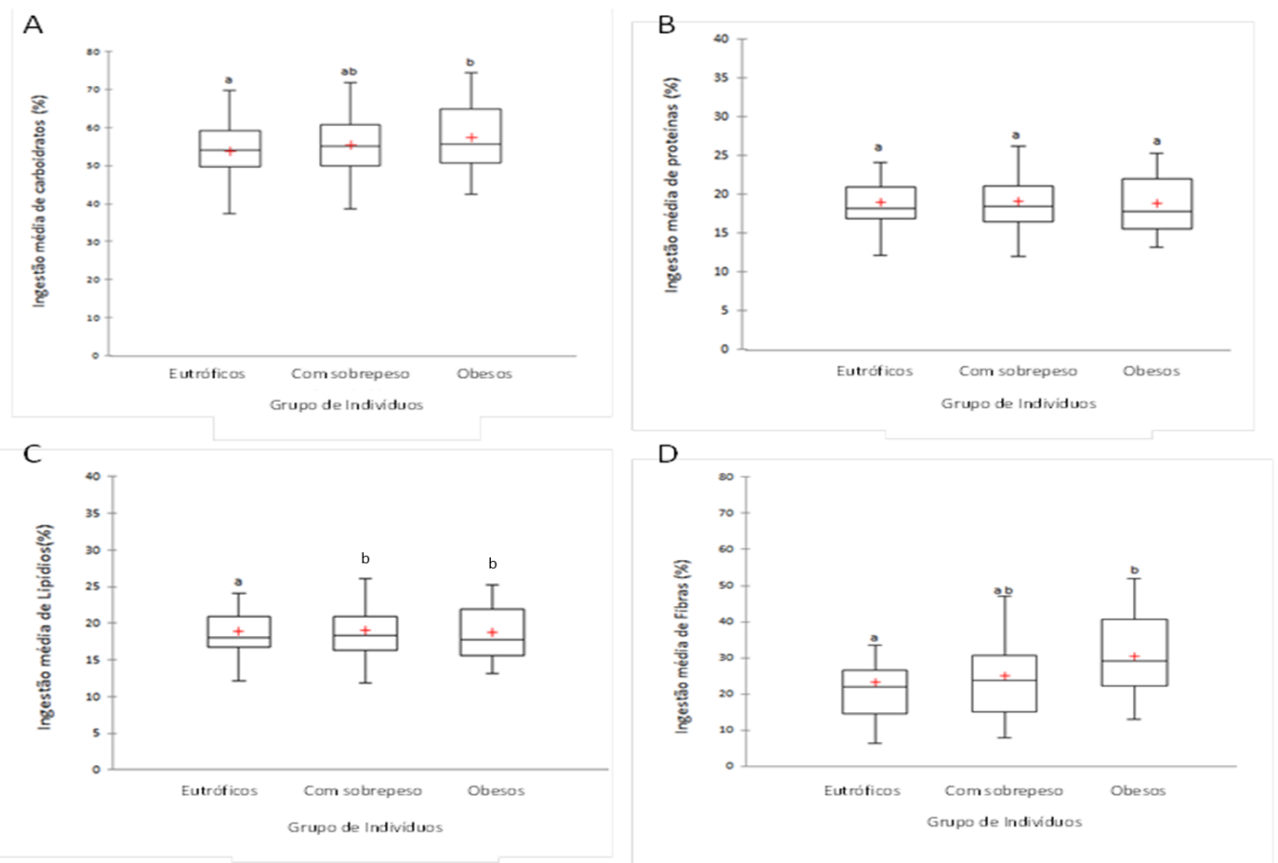


Figura 7. Média da ingestão de macronutrientes pelos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. As letras a,b e indicam diferença significativa no consumo de diferentes nutrientes entre os grupos ($p < 0.05$). A: Carboidratos; B: Proteínas; C: Lipídeos; D: Fibras.

5.3 Resultados das análises para fungos cultiváveis

Fungos filamentosos e leveduras foram isolados das amostras fecais de todos os participantes, pertencentes aos três grupos analisados, eutrófico, com sobrepeso e obesos, em uma contagem média de Log 1,58 UFC/ g de fezes (Tabela 7). As análises de níveis populacionais da micobiota intestinal cultivável não revelaram diferenças significativas entre os três grupos analisados, com exceção dos fungos filamentosos, isolados em maior abundância no grupo dos eutróficos quando comparados ao grupo obeso ($p < 0,05$). Com relação às leveduras, diferenças significativas não foram observadas, entretanto, contagens elevadas foram observadas nos indivíduos obesos. Portanto, os indivíduos eutróficos demonstraram apresentar uma alta contagem de fungos filamentosos e os indivíduos obesos uma contagem elevada de leveduras.

Tabela 7. Contagens de fungos totais, filamentosos e leveduras isoladas dos três grupos de indivíduos.

Contagem média de fungos (UFC Log ₁₀ /g de fezes*)	Grupo de indivíduos			$p < 0,05^{**}$
	Eutrófico (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n= 24)	
Fungos totais	1,58	1,56	1,41	
Filamenotosos	1,28	1,04	0,71	A
Leveduras	0,98	1,08	1,12	

* Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) Log₁₀ por grama de espécimes fecais dos participantes.

** Análises estatísticas significativas: a – comparação entre os valores dos participantes eutróficos e obesos.

No total, foram isoladas 854 amostras de fungos neste estudo, identificados como pertencentes a 34 gêneros ou espécies. A micobiota intestinal cultivável foi mais diversa nos indivíduos do sexo feminino quando comparada com o sexo masculino (Figura 8). Os indivíduos do sexo feminino apresentaram 16 fungos exclusivos, sendo somente dois fungos exclusivos

isolados dos indivíduos do sexo masculino. Um grupo comum formado por 16 fungos diferentes foi identificado em ambos os gêneros.

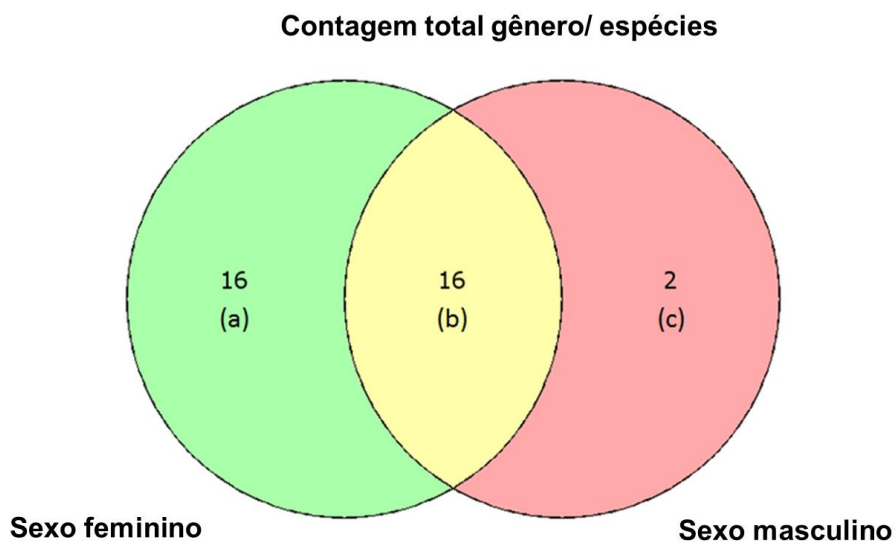


Figura 8. Diagrama de Venn representativo da diversidade de fungos e agrupamento qualitativo de acordo com sua ocorrência exclusiva ou compartilhada entre indivíduos do sexo feminino e masculino. (a) *Acremonium* sp., *Beauveria* sp., *Bipolaris* sp., *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *E. dermatitidis*, *Emmonsia* sp., *Fonsecaea* sp., *G. silvícola*, *Helminthosporium* sp., *Phialophora* sp., *Pichia manshurica*, *Syncephalastrum* sp.; (b) *Aspergillus* sp., *C. albicans*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. robusta*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Dreschlera* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *R. mucilaginoso*, *Rhizopus* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichosporon* sp.; (c) *C. lipolytica*, *L. elongisporus*

A distribuição de gêneros ou espécies de fungos, qualitativamente, foi diferente entre os indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Um grupo comum, composto por 13 gêneros ou espécies de fungos foi verificado, sendo 8 diferentes fungos filamentosos e 5 leveduras (Figura 9).

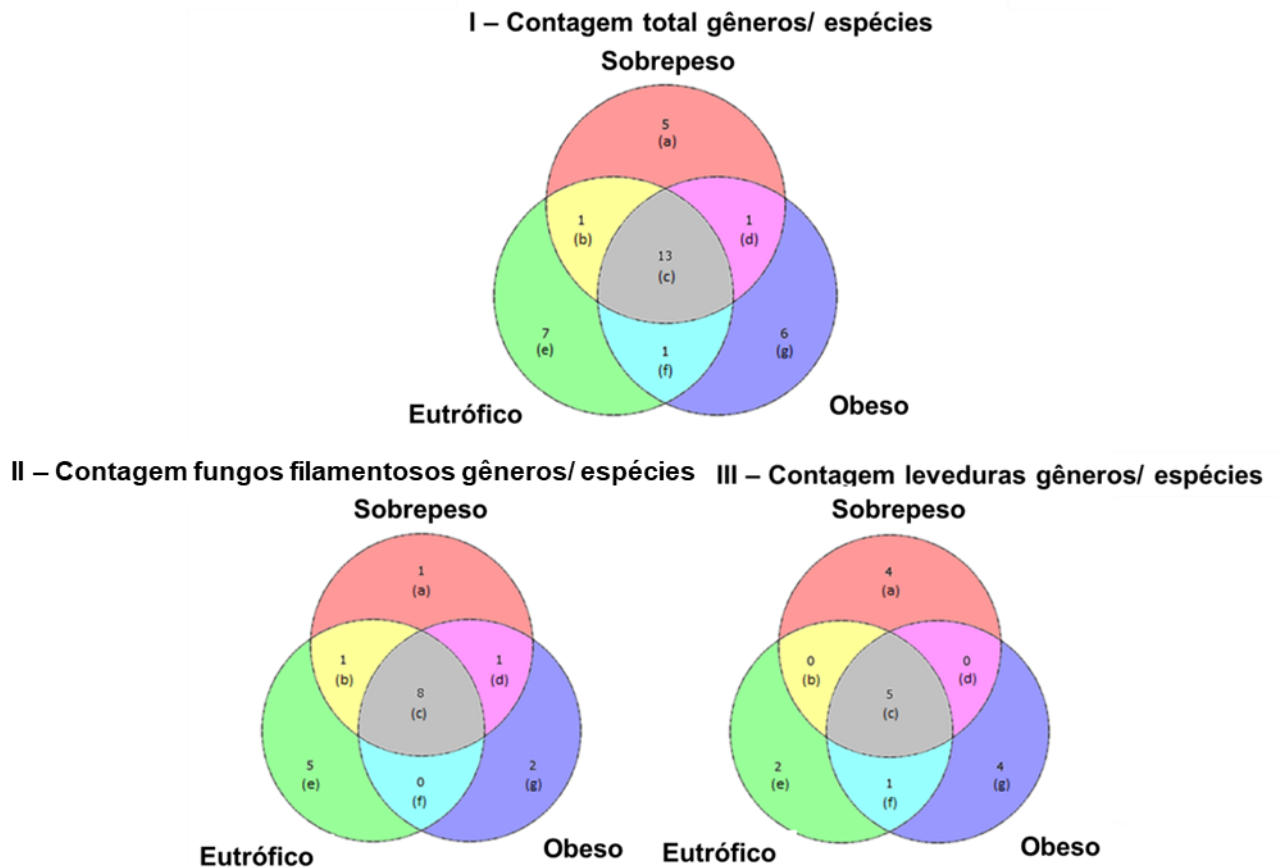


Figura 9. Diagrama de Venn representativo da diversidade de fungos e agrupamento qualitativo de acordo com sua ocorrência exclusiva ou compartilhada entre indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. (a) filamentosos (*Dreschlera* sp.), leveduras (*C. intermedia*, *C. guilhermondii*, *C. lipolytica*, *L. elongisporus*, *Dreschlera* sp.); (b) filamentosos (*Acremonium* sp.); (c) filamentosos (*Aspergillus* sp., *Fonsecaea* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phialophora* sp., *Rhizopus* sp., *Scopulariopsis* sp.), leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. robusta*, *R. mucilaginosa*, *Trichosporon* sp.); (d) filamentosos (*Cladosporium* sp.); (e) filamentosos (*Beauveria* sp., *Bipolaris* sp., *E. dermatitidis*, *Helminthosporium* sp., *Syncephalastrum* sp.), leveduras (*C. pararugosa*, *Pichia manshurica*); (f) leveduras (*G. silvicola*); (g) filamentosos (*Chaetoniium* sp., *Emmonsia* sp.), leveduras (*C. glabrata*, *C. metapsilosis*, *C. krusei*, *C. orthopsilosis*).

Os fungos isolados foram classificados em três filos diferentes: Ascomycota, Basidiomycota e Zigomycota. O filo predominante foi o Ascomycota com 29 diferentes fungos isolados, seguido pelos filos Zigomycota e Basidiomycota com 3 e 2 diferentes fungos isolados, respectivamente. Fungos dos filos Zigomycota e Basidiomycota foram encontrados nos três grupos de indivíduos, exceto *Syncephalastrum* sp., encontrado somente no grupo dos indivíduos eutróficos.

Considerando a abundância relativa por indivíduos nos três grupos, os fungos do filo Ascomycota mais isolados foram: *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*, nas seguintes proporções: 76,39%, 65,28%, 58,33%, 29,17% e 16,67%. As leveduras do filo Basidiomycota mais isoladas nos três grupos foram: *Trichosporon* sp. (30,56%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (15,28%) e os fungos filamentosos foram *Rhizopus* sp. (15,28%) e *Mucor* sp (9,72%). Os demais fungos foram observados em taxas inferiores a 9,0% (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição qualitativa e abundância relativa de fungos filamentosos e leveduras isolados de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

Fungos	Grupos de indivíduos			Total	Abundância relativa (%)
	Eutrófico (n=24)	Sobrepeso (n=24)	Obeso (n=24)		
<i>Paecilomyces</i> sp.	21	19	15	55	76,39
<i>Penicillium</i> sp.	16	14	17	47	65,28
<i>Aspergillus</i> sp.	13	15	14	42	58,33
<i>Trichosporon</i> sp.	9	7	6	22	30,56
<i>Candida parapsilosis</i>	5	8	8	21	29,17
<i>Candida albicans</i>	6	2	4	12	16,67
<i>Rhizopus</i> sp.	3	3	5	11	15,28
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	4	4	11	15,28
<i>Fonsecaea</i> sp.	4	2	3	9	12,50
<i>Geotrichum silvicola</i>	4	0	3	7	9,72
<i>Mucor</i> sp.	2	2	3	7	9,72
<i>Phialophora</i> sp.	3	2	1	6	8,33
<i>Candida robusta</i>	2	2	1	5	6,94
<i>Scopulariopsis</i> sp.	3	1	1	5	6,94
<i>Chaetonium</i> sp.	0	0	3	3	4,17
<i>Cladosporium</i> sp.	0	2	1	3	4,17
<i>Candida guilhermondii</i>	0	2	0	2	2,78
<i>Dreschlera</i> sp.	0	2	0	2	2,78

<i>Candida krusei</i>	0	0	2	2	2,78
<i>Acremonium sp.</i>	1	1	0	2	2,78
<i>Candida glabrata</i>	0	0	1	1	1,39
<i>Candida pararugosa</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1	1	1,39
<i>Pichia manshurica</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Candida intermedia</i>	0	1	0	1	1,39
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Syncephalastrum sp.</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Bipolaris sp.</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Beauveria</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Helmintosporium</i>	1	0	0	1	1,39
<i>Candida lipolytica</i>	0	1	0	1	1,39
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	0	1	0	1	1,39
<i>Candida orthopsilosis</i>	0	0	1	1	1,39
<i>Emmonsia sp.</i>	0	0	1	1	1,39

Considerando a abundância relativa dos fungos isolados nos três grupos (eutrófico, com sobrepeso e obeso), os dados demonstraram que os fungos apresentaram proporções similares. Em termos qualitativos, observa-se maior diversidade no grupo eutrófico quando comparado aos demais (Figura 10).

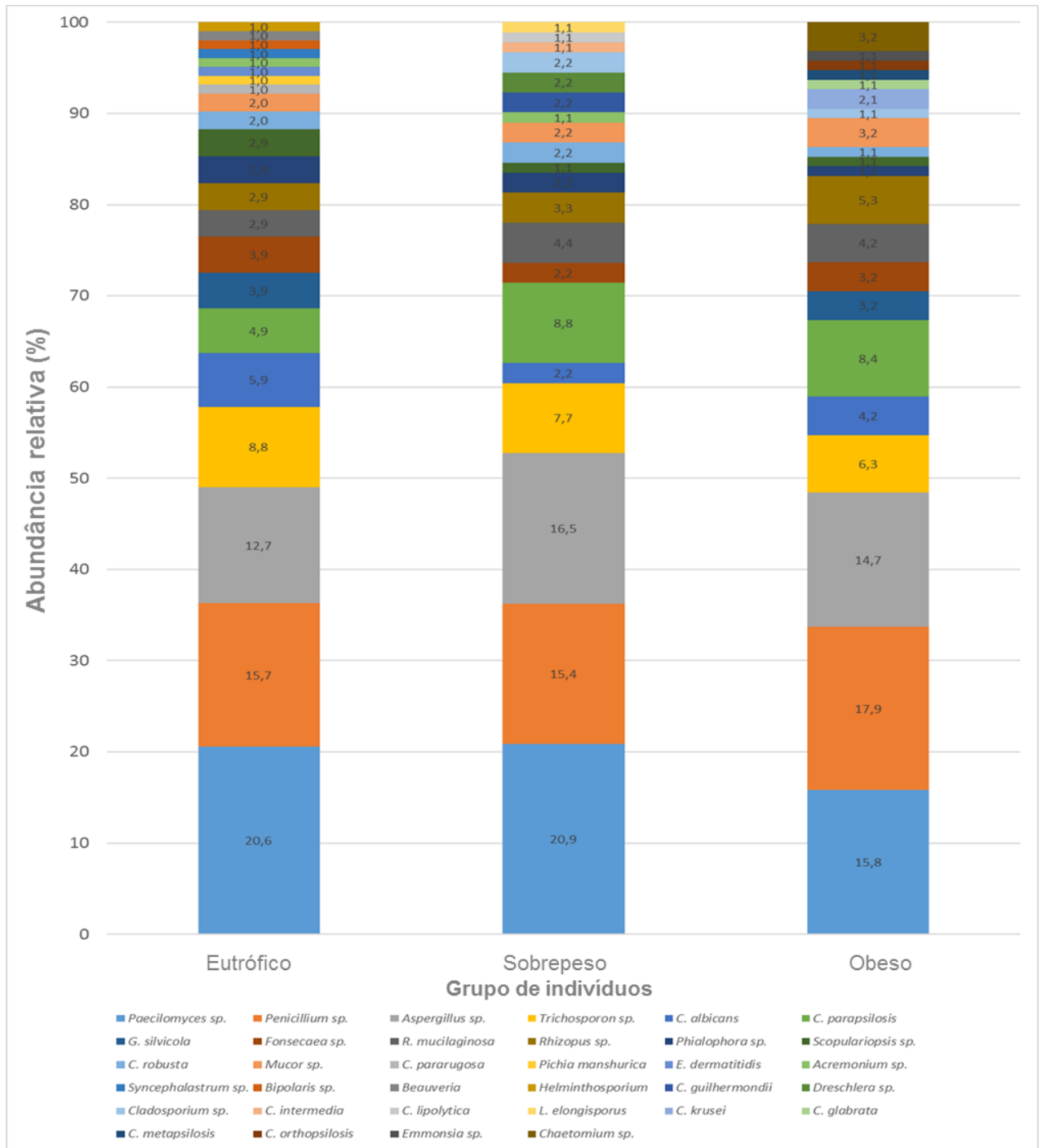


Figura 10. Abundância relativa dos fungos e distribuição entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

A estimativa da diversidade nos três grupos analisados foi calculada através da razão entre a contagem de fungos em UFC/g de fezes e o número de gêneros e/ou espécies exclusivas encontradas em cada grupo para fungos totais, leveduras e fungos filamentosos. Foi observada uma estimativa maior de diversidade de fungos totais e filamentosos no grupo dos indivíduos com sobrepeso e uma menor estimativa de diversidade de fungos filamentosos nos indivíduos obesos (Figura 11).

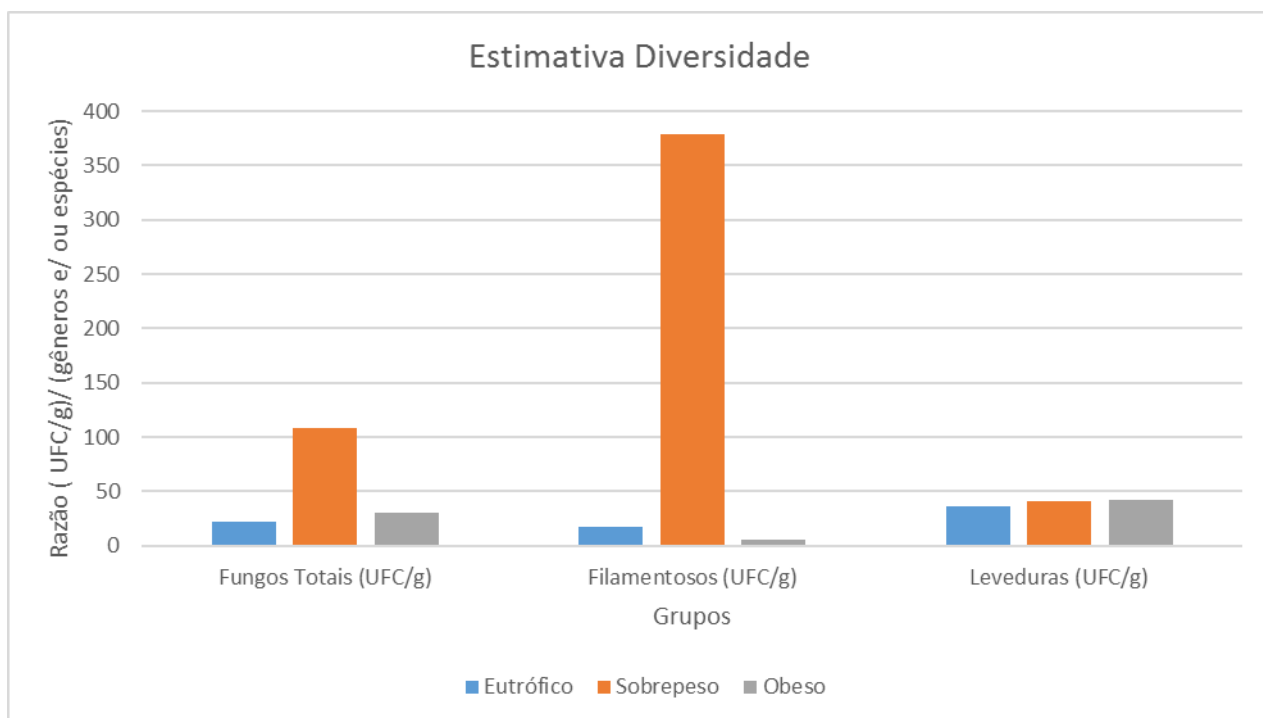


Figura 11. Estimativa da diversidade dos fungos entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

Não foi observada correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) através do Teste de Correlação de Spearman entre os três grupos avaliados para macronutrientes (carboidratos, proteínas, lípidos e fibras e a contagem de fungos (leveduras, fungos totais e filamentosos), exceto no grupo com sobrepeso, onde foi observada uma correlação positiva ($r = 0,534$) entre o macronutriente carboidrato e a contagem de fungos filamentosos (Figura 12a).

Para avaliar os grupos com relação a presença de fungos e quantidade de macronutrientes ingeridos foi realizada uma análise de correlação canônica. As duas primeiras funções discriminantes (axis 1 e 2) expressaram 84,1% da variação total (48,5% para a primeira função discriminante e 35,6% para a

segunda). Os autovalores, que indicam a relação entre variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos para uma função, foram 0,082 e 0,060 para a primeira e a segunda funções, respectivamente. O grupo eutrófico foi o mais diferenciado. O macronutriente proteína e a levedura *C. parapsilosis* exerceram um papel importante na discriminação do grupo no axis 2 e o grupo eutrófico foi o que mais se diferenciou dos demais com relação a estas variáveis discriminatórias. O macronutriente carboidrato (axis 2) e os fungos *Penicillium* sp. e *Fonsecaea* sp (axis 1) foram os responsáveis pela separação do grupo obeso dos demais. Não foi possível agrupar os indivíduos com sobrepeso com relação às funções discriminantes analisadas nos dois axis, portanto esse grupo é caracterizado como não homogêneo (Figura 12b).

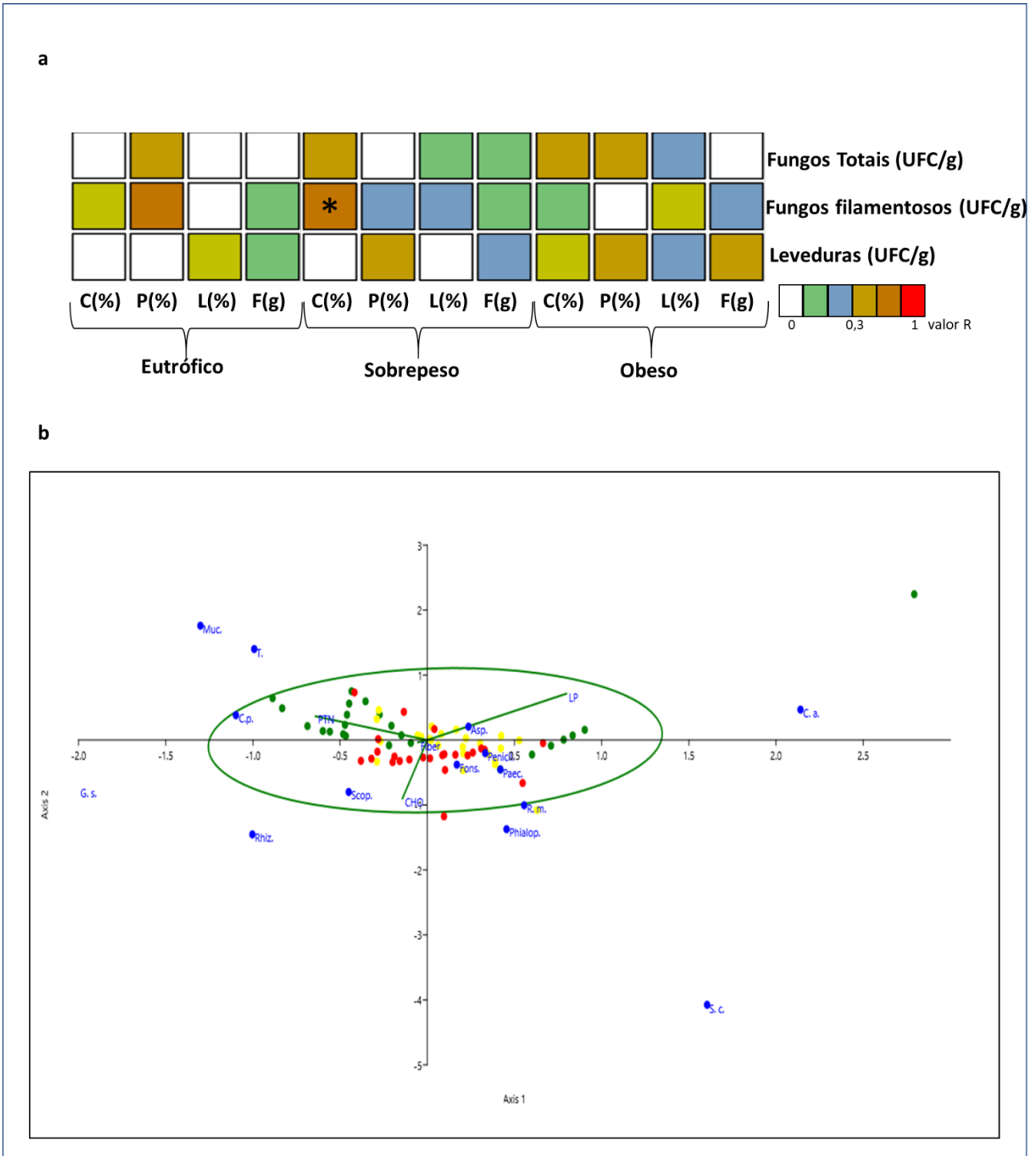


Figura 12. Relação entre microbiota humana intestinal cultivável e macronutrientes. (a) Mapa de correlação de Spearman demonstrando associações entre contagem de fungos totais, fungos filamentosos e leveduras (UFC/g de fezes) com os dados de macronutrientes. Abreviaturas: C: Carboidratos; P: Proteínas; L: Lípides, F: Fibras. CHO: Carboidratos; P: Proteínas; L: Lípides, C.p.: *Candida parapsilosis*, C.a.: *Candida albicans*; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; G.s.: *Geotrichum silvicola*; R.m.: *Rhodotorula mucilaginosa*; T.: *Trichosporon* sp., Paec.: *Paecilomyces* sp., Penicil.: *Penicillium* sp., Asp.: *Aspergillus* sp., Muc.: *Mucor* sp., Rhiz.: *Rhizopus* sp., Fons.: *Fonsecaea* sp., Phialop.: *Phialophora* sp., Scop.: *Scopulariopsis* sp. Círculos verdes: indivíduos eutróficos; círculos amarelos: indivíduos com sobrepeso; círculos vermelhos: indivíduos obesos.

5.4 Resultados das análises moleculares

5.4.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O estudo do perfil da diversidade fúngica utilizando *nested* PCR-DGGE revelou diferenças na estrutura das comunidades de fungos dos três grupos avaliados (Figura 13). O padrão de bandeamento obtido nos experimentos de PCR-DGGE foi considerado para estimar a estrutura da comunidade fúngica nas amostras fecais provenientes de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

Cada banda de amplicon visualizada nos géis foi considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU). A quantidade de bandas detectáveis foi considerada como indicativo para avaliação de riqueza e mostrou que nos espécimes fecais avaliados a riqueza é baixa (índice de Margalef <2,0) nos três grupos, sendo maior nos eutróficos, seguido pelos grupos sobrepeso e obeso. (Tabela 9, Figura 13).

Tabela 9. Diversidade da composição da microbiota intestinal humana em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos relacionados a riqueza.

Grupo	Nº OTUS	Nº indivíduos	Nº OTUS exclusivas	Riqueza
				Margalef
Eutrófico	26	24	0	1,74
Sobrepeso	24	24	12	1,69
Obeso	20	24	0	1,54

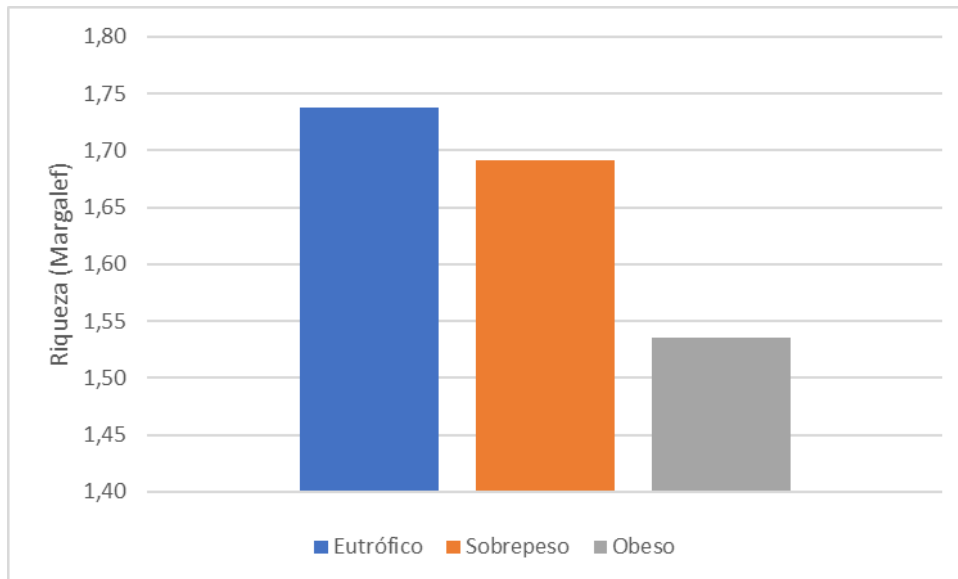


Figura 13. Análise da variável riqueza entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obeso.

Na análise multivariada da estrutura da diversidade fúngica disposta no dendrograma de similaridade, de acordo com o perfil de bandeamento, foi observado o agrupamento das OTUs em três *clusters* distintos. No *cluster* 1 estão agrupados a maior parte dos indivíduos eutróficos (67%) e dos indivíduos com sobrepeso (54%). No *cluster* 2 estão agrupados a maior parte dos indivíduos obesos (67%) e o *cluster* 3 é o que apresenta menor similaridade entre as amostras e apresentou predomínio de indivíduos com sobrepeso (29%) (Figura 14).

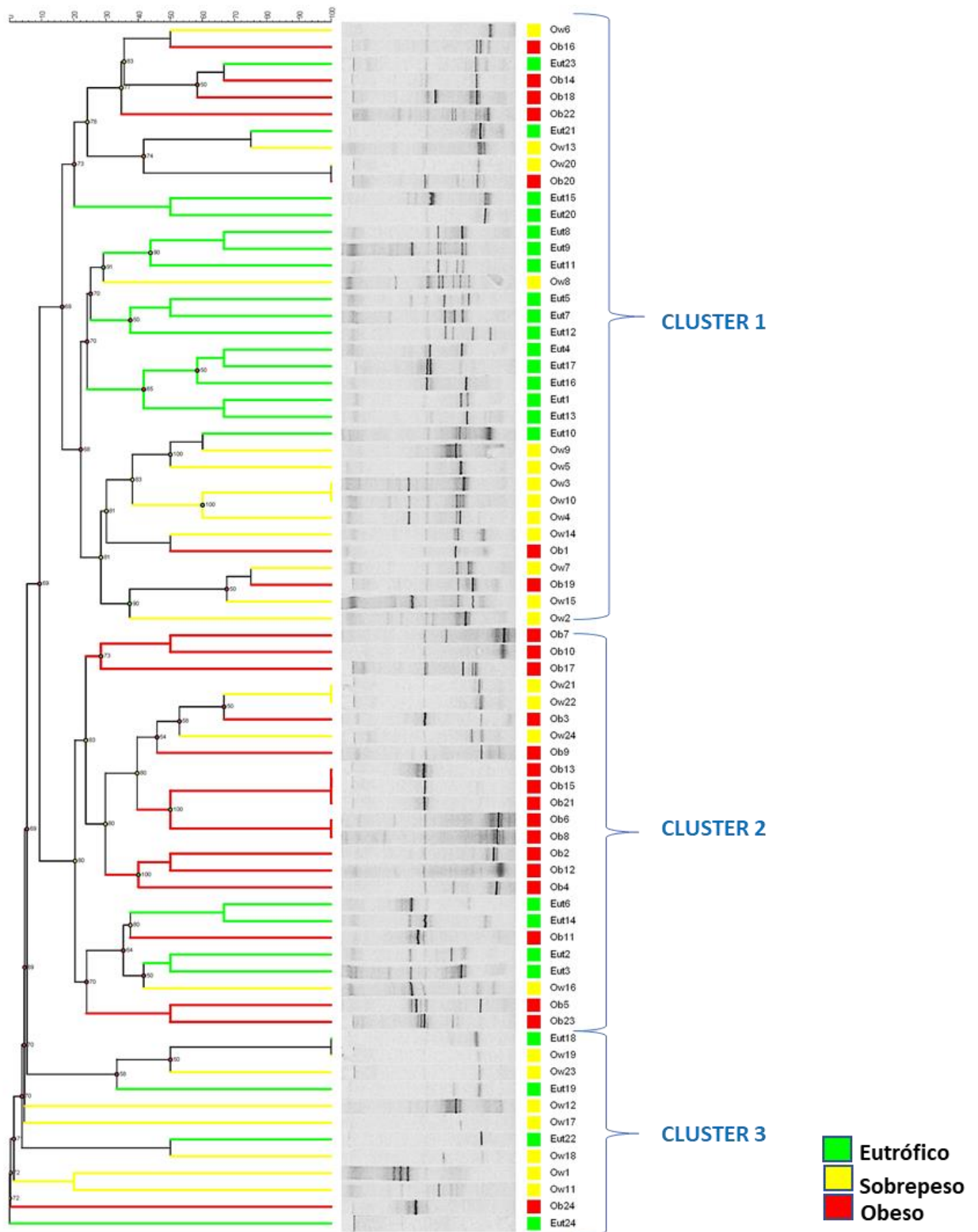


Figura 14. DAGGE fingerprinting e análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do gene de fungos DNAr 18S amplificado a partir do DNA metagenômico extraído de amostras de fezes. Cluster 1 constituído majoritariamente por indivíduos eutróficos; Cluster 2 - constituído majoritariamente por indivíduos obesos e Cluster 3 - constituído majoritariamente por indivíduos com sobrepeso.

Analisando por indivíduos presentes nos *clusters*, tal como apresentado na figura 15, o *cluster* C1 é formado pela maioria dos participantes, 36 indivíduos, sendo 7 obesos (19,4%), 13 com sobrepeso (36,1%) e 16 indivíduos eutróficos (44,5%). O *cluster* C2 é composto por 24 indivíduos sendo 16 obeso (66,6%), 04 com sobrepeso (16,7%) e 04 eutróficos (16,7%). O *cluster* C3, o menos representativo é composto por 12 indivíduos, dos quais 01 obeso (8,3%), 07 com sobrepeso (58,4%) e 4 eutróficos (33,3%).

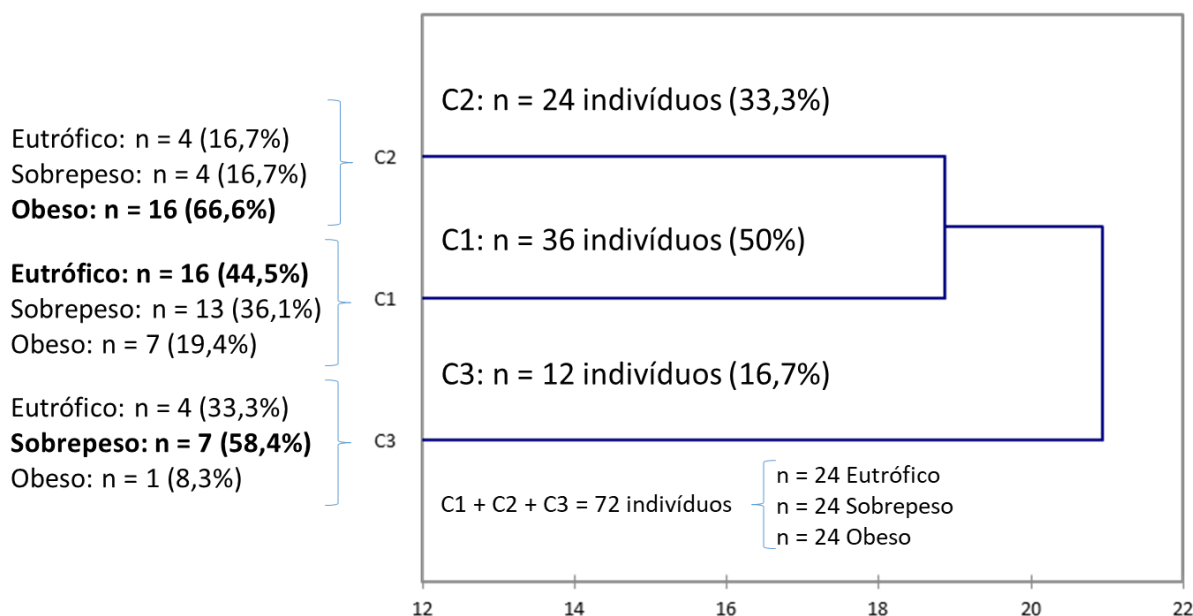


Figura 15. Agrupamento dos indivíduos participantes do estudo de acordo com o perfil de bandas correspondetes à região do RNA18S de fungos amplificadas a partir do DNA metagenômico extraído de amostras de fezes separadas por DGGE.

Foi realizada a análise de correlação canônica para avaliar a relação dos parâmetros antropométricos e dados clínicos e nutricionais dos participantes no agrupamento das OTUs obtidas na análise de DGGE dos fungos.

As duas primeiras funções discriminantes (axis 1 e 2) expressaram 24,05% da variação total (13,77% para a primeira função discriminante e 10,28% para a segunda). Os autovalores, que indicam a relação da variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos para uma função, foram 0,491 e 0,366 para a primeira e a segunda funções, respectivamente. Foi observada uma separação do grupo eutrófico e de maior parte do grupo com sobrepeso do grupo obeso. Os parâmetros que mais influenciaram para o agrupamento dos indivíduos eutróficos foram cortisol, HDL, porcentagem de lipídeos e proteínas da dieta consumida. Os parâmetros predominantes para

agrupamento dos indivíduos obesos foram todos os dados antropométricos, colesterol total, LDL, triglicerídeos, HOMA-IR, Hb, creatinina, e porcentagem de carboidrato e de fibras (Figura 16).

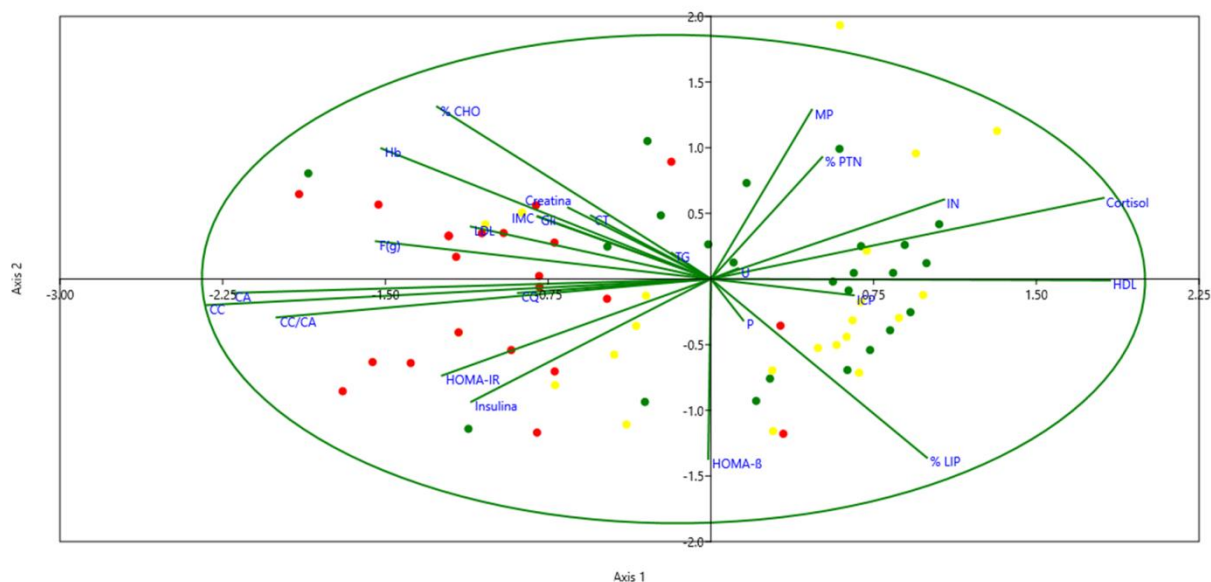


Figura 16. Análise de Correlação Canônica (CCA) entre as comunidades fúngicas determinada pelos genes DNAr 18S e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso. Círculos verdes: indivíduos eutróficos; círculos amarelos: indivíduos com sobrepeso; círculos vermelhos: indivíduos obesos. Abreviaturas: CA: circunferência abdominal; CC: circunferência da cintura; CQ: circunferência quadril; CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência abdominal; IMC: índice de massa corporal; F: fibras; CHO: carboidratos; PTN: proteínas; LIP: lipídeos; CT: colesterol total; Hb: hemoglobina; IN: alimentos in natura; MP: alimentos minimamente processados; ICP: ingrediente culinário processado; U: alimentos ultraprocessados.

5.4.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Foi obtido o número de cópias de DNA/g de fezes para fungos dos três grupos de indivíduos. A diferença entre as contagens médias de cópias de DNA/g de fezes obtida nos três grupos foi estatisticamente significativa. Para avaliar a diferença das médias entre os grupos foi utilizado o teste de Bonferroni (nível de significância de 0,0167 (Tabela 10).

O número de cópias de DNA/ g de fezes de fungos no grupo dos indivíduos obesos foi maior que o observado nos indivíduos com o sobrepeso, e neste grupo também foi maior que o observado nos indivíduos eutróficos (Figura 17).

Tabela 10. Estatística descritiva dos dados de quantificação absoluta por PCR em tempo real do DNAr 18S de fungos nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.

Estatística descritiva	Eutrófico	Sobrepeso	Obeso
	(nº de cópias de DNA/g fezes)		
Valor mínimo	3,68E+04	1,84E+05	9,20E+05
Valor máximo	7,24E+08	3,62E+09	1,81E+10
Média	9,50E+07	4,75E+08	2,37E+09
Desvio padrão	1,78E+08	8,90E+08	4,45E+09

Teste Bonferroni: Valores de p: Eutrófico X Obeso < 0,0001 e Eutrófico X Sobrepeso e Sobrepeso X Obeso = 0,034.

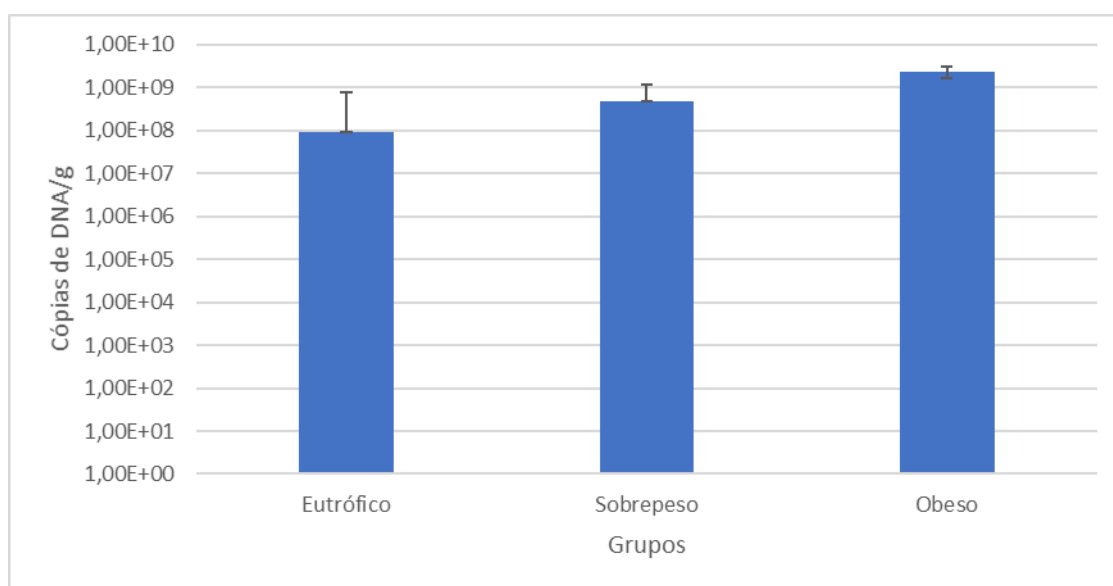


Figura 17. Contagem média de cópias de DNA/g de fezes de fungos nos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso ($p < 0,05$).

Foi realizada a análise estatística de Spearman para avaliar a correlação entre o número de cópias de DNA de fungos e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Foi observada correlação positiva ($p < 0,05$) entre o número de cópias de DNA de fungos e os parâmetros cortisol ($r = 0,438$), hemoglobina ($r = 0,712$) e alimentos minimamente processados ($r = 0,473$) no grupo dos indivíduos eutróficos e entre o número de cópias de DNA de fungos e os parâmetros glicose ($r = 0,432$) e alimentos processados ($r = 0,484$) no grupo dos indivíduos com sobrepeso. No grupo dos indivíduos obesos foi observada correlação positiva ($p < 0,05$) entre o número de cópias de DNA de fungos e o parâmetro lipídeo ($r = 0,503$) e correlação negativa com os parâmetros carboidrato ($r = -$

0,549), alimentos *in natura* ($r = -0,513$) e alimentos ultraprocessados ($r = -0,430$) (Figura 18).

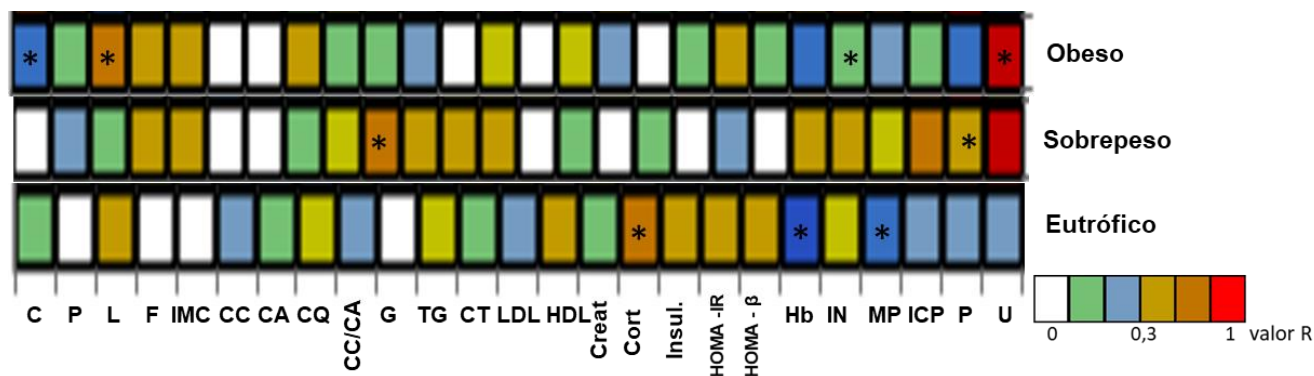


Figura 18. Mapa de calor de correlação de Spearman entre o número de cópias de DNAr 18S de fungos e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso. Abreviaturas: C: carboidrato (%); P: proteína (%); L: lipídeo (%); F: fibra (g); IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura CA: circunferência abdominal; CQ: circunferência quadril; CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência abdominal; G: glicose; TG: triglicerídeos; CT: colesterol total; Creat.: creatinina; Cort: cortisol; Insul.: insulina; Hb: hemoglobina; IN: alimentos *in natura*; MP: alimentos minimamente processados; ICP: ingrediente culinário processado; U: alimentos ultraprocessados (* $r < 0,05$).

A análise de componente principal (PCA) foi realizada para verificar o agrupamento entre o número de cópias de DNA/g de fungos e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Foi observado um agrupamento dos indivíduos do grupo obeso correlacionado ao aumento do número de cópias de DNA/g de fezes e dos parâmetros colesterol total, LDL, triglicerídeos, insulina, glicose, HOMA-IR, HOMA-β, hemoglobina, creatinina, porcentagem de carboidrato, fibras e dados antropométricos (Figura 19).

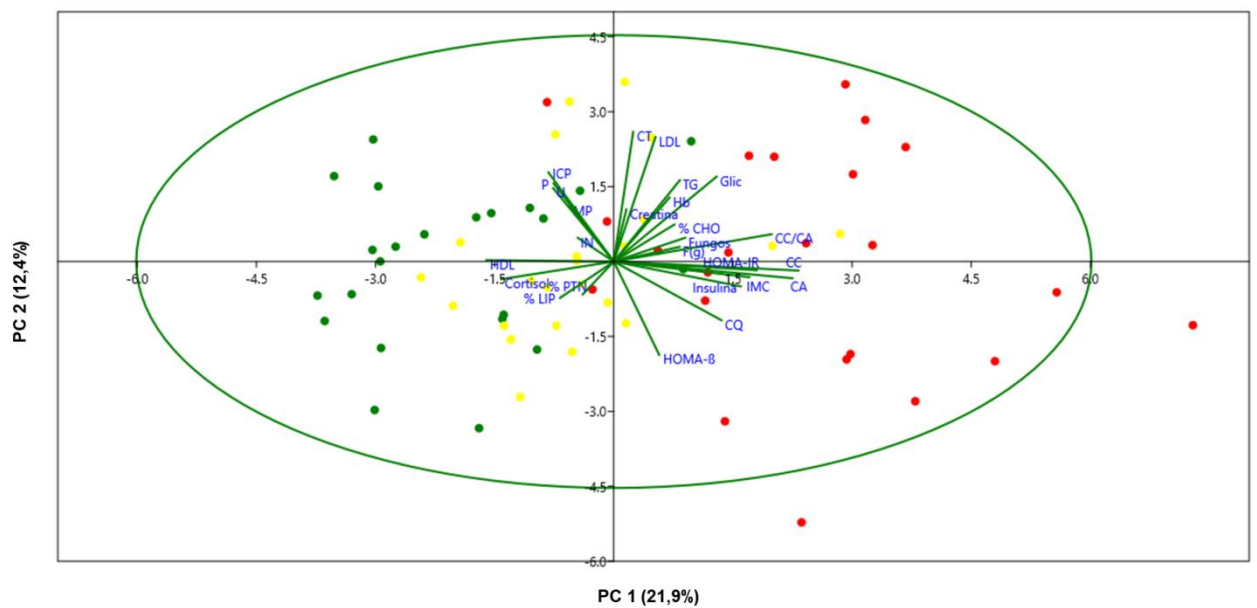


Figura 19. Análise de Componente Principal (PCA) entre o número de cópias de DNAr 18S de fungos e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso. Abreviaturas: CA: circunferência abdominal; CC: circunferência da cintura; CQ: circunferência quadril; CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência abdominal; IMC: índice de massa corporal; F: fibras; CHO: carboidratos; PTN: proteínas; LIP: lipídeos; CT: colesterol total; Hb: hemoglobina; IN: alimentos in natura; MP: alimentos minimamente processados; ICP: ingrediente culinário processado; U: alimentos ultraprocessados.

Para quantificação do DNA dos filos Ascomycota e Basidiomycota foi utilizada a análise quantitativa relativa do PCR em tempo real pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi realizado o teste estatístico de Grubs para determinação dos *outliers* dos valores de ΔCT dos filos Ascomycota e Basidiomycota. O teste de normalidade de Shapiro Wilk revelou que os valores ΔCT não seguem uma distribuição normal ($p < 0,05$). Para verificação da diferença das médias de ΔCT dos filos Ascomycota e Basidiomycota dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso utilizados para calcular o $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis, o qual apresentou $p < 0,05$ ($p = 0,001$) para o filo Ascomycota, indicando assim a diferença das médias de ΔCT dos filos analisados. Para determinar quais médias de ΔCT do filo Ascomycota apresentavam diferença estatisticamente significativa foi utilizado o teste de Bonferroni com nível de significância 0,0167, o qual demonstrou diferença nas médias de ΔCT entre os grupos eutrófico e sobrepeso ($p = 0,006$) e eutrófico e obeso ($p = 0$). Não foram verificadas diferenças nas médias de ΔCT entre os grupos sobrepeso e obeso ($p = 0,430$).

Para o filo Basidiomycota não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias de ΔCT dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso (Teste de Kruskal Wallis $p = 0,561$).

O grupo eutrófico contém 2,32 vezes mais DNA do filo Ascomycota do que o grupo obeso e 2,02 vezes mais do que o grupo sobrepeso. O grupo sobrepeso apresenta 1,6 vezes mais DNA do filo Ascomycota do que o grupo obeso. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a concentração de DNA do filo Basidiomycota entre os três grupos de indivíduos avaliados (Tabela 11, Figura 20).

Tabela 11. Quantificação relativa por PCR em tempo real do DNAr dos filios Ascomycota e Basidiomycota em amostras de fezes de indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.

Filo	Quantificação relativa		
	Eutrófico X Sobrepeso	Eutrófico X Obeso	Sobrepeso X Obeso
Ascomycota	2,02*	3,23*	1,60*
Basidiomycota	0,70	0,96	1,37

* $p < 0,05$

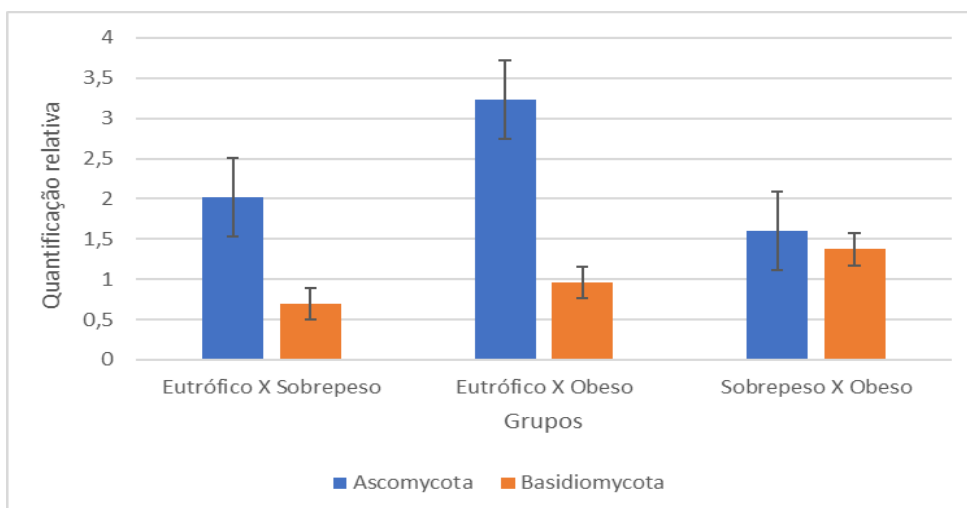


Figura 20. Quantificação relativa do DNAr dos filios Ascomycota e Basidiomycota em amostras de fezes de indivíduos dos grupos eutrófico, com sobrepeso e obeso.

5.4.3 Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Foram detectados e quantificados fungos totais, leveduras e *Candida albicans* pelo método de hibridização *in situ* fluorescente a partir das amostras de fezes dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média das densidades de fungos totais e leveduras nos três grupos analisados. A contagem média de *C. albicans* foi estatisticamente diferente entre os grupos eutrófico e obeso e com sobrepeso e obeso, sendo observada maior densidade de *C. albicans* nos indivíduos obesos (Tabela 12, Figuras 21 e 22).

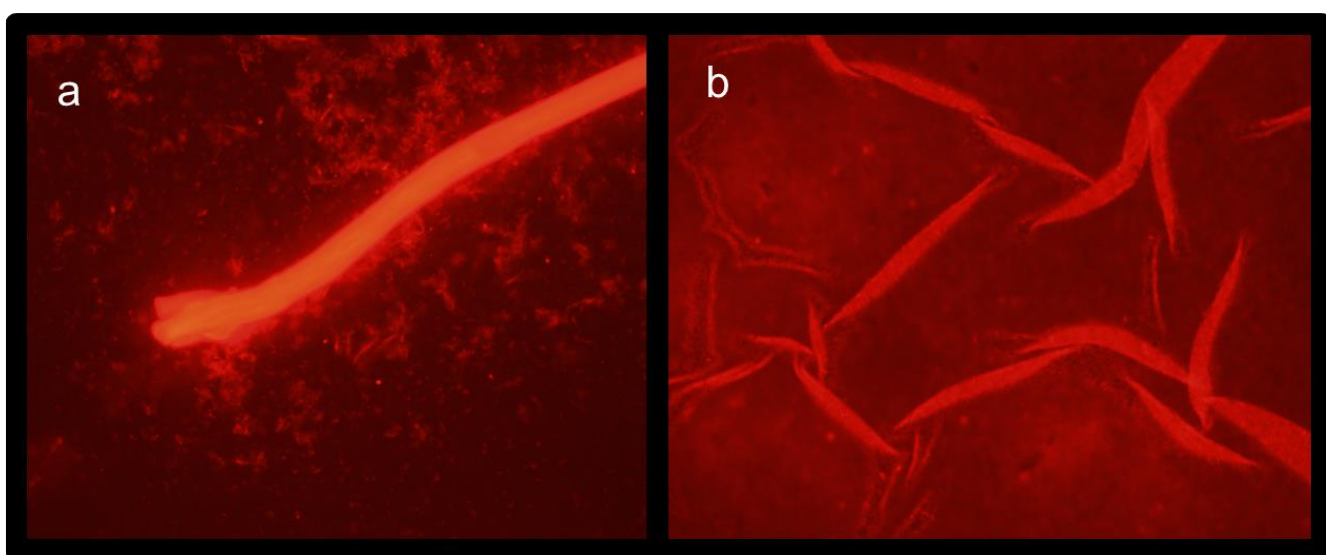


Figura 21. Micrografia de lâmina hibridizada com sonda FUN para contagem de fungos totais em indivíduos obesos (a) e eutróficos (b) pela técnica de FISH.

Tabela 12. Estatística descritiva da quantificação de fungos totais, leveduras e *C. albicans* por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Estatística	Eutrófico			Sobrepeso			Obeso		
	FUN	PF2	Caal ^a	FUN	PF2	Caal ^a	FUN	PF2	Caal ^b
Média ($\mu\text{m}^2/\text{g}$ de fezes)	3,07E+10	1,07E+09	2,71E+08	2,43E+10	1,04E+09	2,47E+08	3,76E+10	1,82E+09	7,97E+08
Desvio padrão	3,27E+10	4,88E+08	2,46E+08	2,06E+10	6,64E+08	2,53E+08	3,86E+10	1,26E+09	7,84E+08

*letras distintas as médias diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis. FUN: sonda para fungos totais; PF2: sonda para leveduras e Caal: sonda para *Candida albicans*.

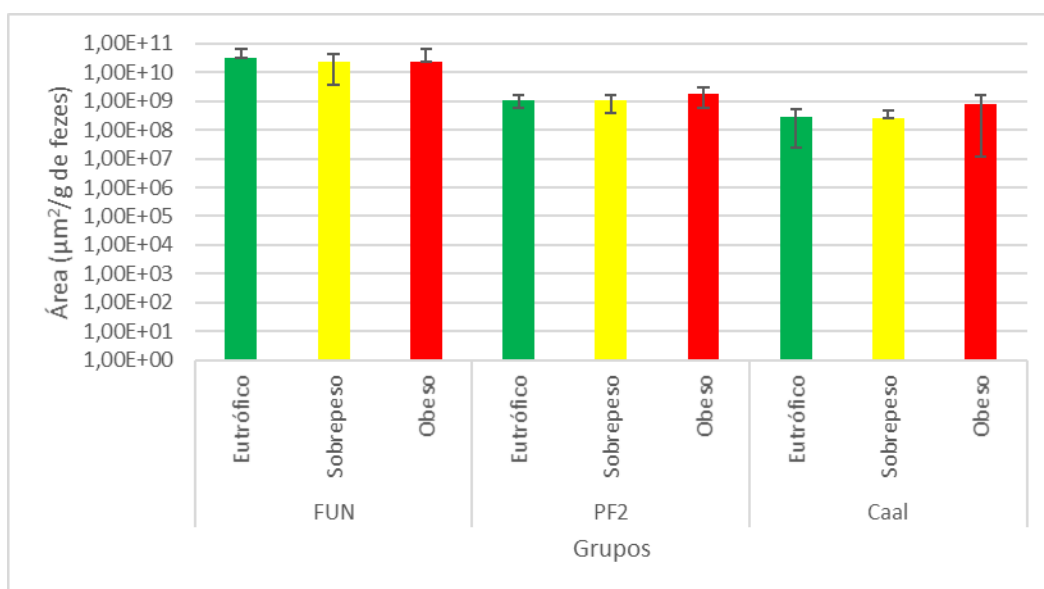


Figura 22. Quantificação de fungos totais, leveduras e *C. albicans* por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). FUN: sonda fungos totais; PF2: sonda leveduras e Caal: sonda *C. albicans*.

Foi realizada a análise estatística de Spearman para avaliar a correlação entre a densidade de fungos totais, leveduras e *C. albicans* e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Foi observada correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a densidade de fungos totais e o parâmetro HOMA - IR ($r = 0,528$), entre a densidade de leveduras e glicose ($r = 0,424$) e densidade de *C. albicans* e porcentagem de carboidratos consumidos ($r = 0,446$) no grupo dos indivíduos eutróficos. No grupo dos indivíduos com sobrepeso foi observada correlação positiva estatisticamente significativa entre densidade de leveduras e o parâmetro lipídeo ($r = 0,502$) e correlação negativa com % de consumo de carboidrato ($r = -0,512$) e a densidade de *C. albicans* e o parâmetro % de consumo de carboidrato ($r = -0,447$). No grupo dos indivíduos obesos foi observada correlação negativa estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a densidade de fungos totais e o parâmetro razão circunferência cintura e circunferência abdominal ($r = -0,415$), entre leveduras e o consumo de alimentos processados ($r = -0,512$) e entre *C. albicans* e o consumo de alimentos processados ($r = -0,512$) (Figura 23).

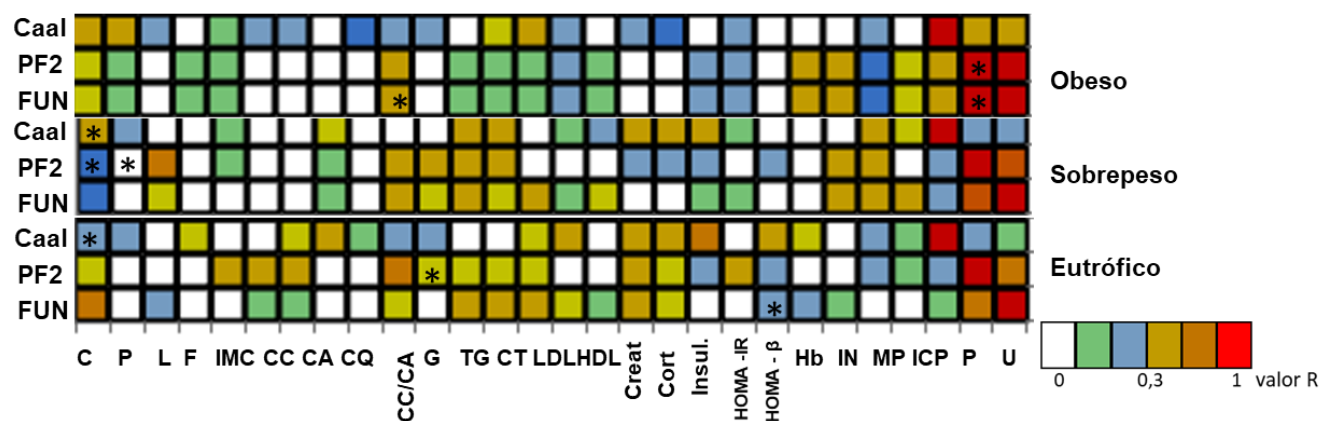


Figura 23. Mapa de calor de correlação de Spearman entre a quantidade de fungos totais, leveduras e *C. albicans* e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso. Abreviaturas: C: carboidrato (%); P: proteína (%); L: lipídeo (%); F: fibra (g); IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura CA: circunferência abdominal; CQ: circunferência quadril; CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência abdominal; G: glicose; TG: triglicerídeos; CT: colesterol total; Creat.: creatinina; Cort: cortisol; Insul.: insulina; Hb: hemoglobina; IN: alimentos in natura; MP: alimentos minimamente processados; ICP: ingrediente culinário processado; U: alimentos ultraprocessados (* p < 0,05).

A análise de componente principal (PCA) foi realizada para verificar a correlação entre a densidade de fungos totais, leveduras e *C. albicans* ($\mu\text{m}^2/\text{g}$ de fezes) e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Foi observado um agrupamento dos indivíduos do grupo obeso correlacionado ao aumento da densidade de fungos totais, leveduras e *C. albicans* ($\mu\text{m}^2/\text{g}$ de fezes) e dos parâmetros colesterol total, LDL, triglicerídeos, insulina, glicose, HOMA-IR, HOMA-β, hemoglobina, creatinina, porcentagem de carboidratos e fibras consumidos e dados antropométricos (Figura 24).

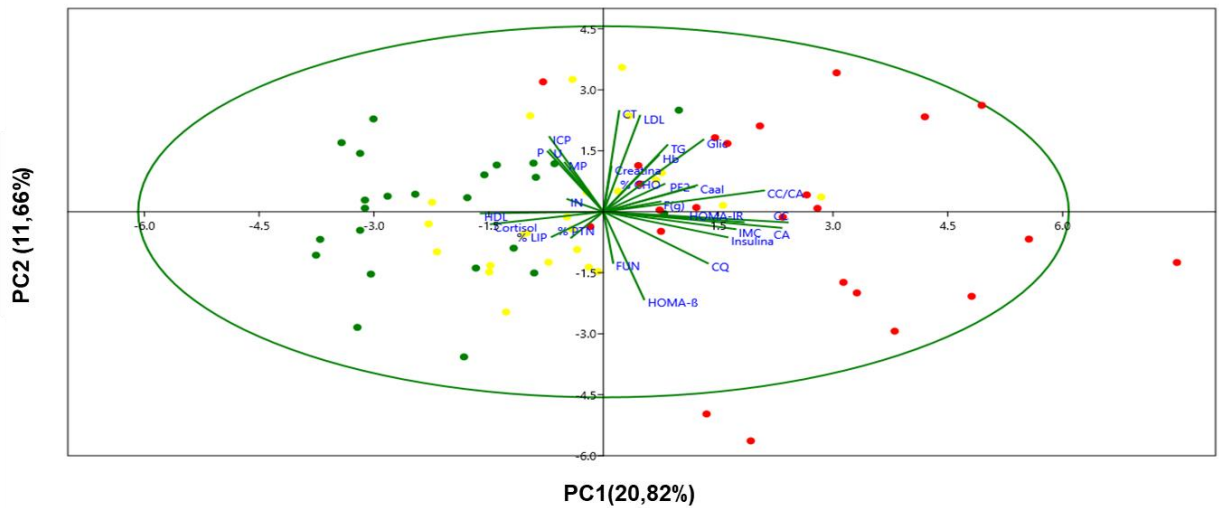


Figura 24. Análise de Componente Principal (PCA) entre a densidade de fungos totais, leveduras e *C. albicans* ($\mu\text{m}^2/\text{g}$ de fezes) e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutróficos, sobrepeso e obeso. Círculos verdes: indivíduos eutróficos; círculos amarelos: indivíduos com sobrepeso; círculos vermelhos: indivíduos obesos. Abreviaturas: CA: circunferência abdominal; CC: circunferência da cintura; CQ: circunferência quadril; CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência abdominal; IMC: índice de massa corporal; F: fibras; CHO: carboidratos; PTN: proteínas; LIP: lipídeos; CT: colesterol total; Hb: hemoglobina; IN: alimentos in natura; MP: alimentos minimamente processados; ICP: ingrediente culinário processado; U: alimentos ultraprocessados.

6 DISCUSSÃO

A obesidade é considerada atualmente uma doença pandêmica associada à comorbidades relevantes para a saúde (BORGES, 2011; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011; BAHIA et al., 2102). Neste estudo foram recrutados e avaliados 72 indivíduos, classificados em: eutróficos, com sobrepeso e obesos. A amostragem foi por conveniência, selecionando integrantes da comunidade e do serviço de nutrição do Hospital Universitário, na cidade de Juiz de Fora/MG, uma cidade de porte médio na região sudeste do Brasil. No grupo de indivíduos obesos predominou o sexo feminino e a idade média de 42,7 anos, com renda mensal entre 1 e 3 salários mínimos de referência no Brasil, em 2015.

A obesidade é considerada uma forma de agravo à saúde com frequência semelhante entre ambos os sexos, influenciada por fatores econômicos com implicações diretas na educação e comportamento. Já o sobrepeso é mais comum em indivíduos do sexo masculino (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; FERREIRA et al., 2009; KAIN et al., 2014). A obesidade está relacionada também a fatores sociais. O nível socioeconômico dos indivíduos afeta o seu acesso a informação, a escolha alimentar e ao padrão de atividade física, sendo, portanto, um fator relevante para escolha dos hábitos de vida e, conseqüentemente, influenciando no desenvolvimento da obesidade (FERREIRA E MAGALHÃES, 2005; OLIVEIRA, 2013). Menores níveis de escolaridade e renda e aumento da idade estão correlacionados ao excesso de peso e obesidade. A prevalência da obesidade duplica a partir dos 25 anos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Nos indivíduos do grupo obeso deste estudo foram encontrados os fungos *Aspergillus* e *Rhodotorula*, os quais já foram descritos como relacionados ao aumento da pressão arterial em indivíduos (RODRÍGUEZ, 2015). Dentre às comorbidades associadas à obesidade, a alteração da pressão arterial (PA) foi a mais observada neste estudo (62% dos obesos, 12% dos com sobrepeso e 4% dos eutróficos). A alteração da PA é o distúrbio vascular mais comumente relacionado com o aumento de peso, sendo associada diretamente ao IMC. A prevalência de alteração de PA é até três vezes maior em pacientes obesos (GALVÃO e KOHLMANN, 2002). No Brasil, 25,7% da população foi diagnosticada com hipertensão, sendo que as mulheres apresentam maior diagnóstico. O indicador

aumenta com a idade e com a menor escolaridade (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os resultados do presente estudo demonstraram que as médias de glicose e insulina estavam dentro dos valores de referência nos três grupos de indivíduos. Entretanto, as médias do grupo obeso em relação ao grupo eutrófico foram significativamente maiores para os dois parâmetros avaliados. A média do índice HOMA-IR também estava dentro dos valores normais, porém, significativamente maior no grupo obeso. A obesidade está diretamente relacionada ao diabetes tipo 2 e é caracterizada pela resistência insulínica (KAHAN e FLIER, 2000). Esses achados corroboram com a maior tendência a resistência insulínica, possível intolerância à glicose e o desenvolvimento de Diabetes tipo 2 (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHA-JUNIOR, 2003).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos nos perfis de triglicérides, colesterol total e colesterol LDL. A literatura descreve ausência de diferença no perfil lipídico de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos (DOS SANTOS et al., 2014). Uma dieta hipercalórica e hiperlipídica associada ao sedentarismo da população brasileira, entre outras causas, podem resultar em um perfil lipídico alterado (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHA-JUNIOR, 2003).

Os níveis de cortisol estavam dentro dos valores de referência nos três grupos de indivíduos, com diferença significativa entre aqueles dos grupos eutrófico e obeso, sendo que este último grupo apresentou níveis mais elevados deste parâmetro. O cortisol é um glicocorticoide sintetizado a partir do colesterol e com importantes efeitos no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, portanto, sua liberação é aumentada em indivíduos obesos. Entretanto, como o clearance metabólico de cortisol apresenta forte correlação com a quantidade de gordura abdominal, ou seja, quanto maior a quantidade de gordura visceral, maior o clearance metabólico de cortisol, resultando em redução dos seus níveis plasmáticos. No obeso, sua liberação é aumentada, mas como o metabolismo desses indivíduos é aumentado, seus níveis séricos, geralmente, encontram-se dentro dos valores de referência (BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008). Importante salientar que outros fatores estão relacionados ao aumento de cortisol, como por exemplo, o *stress*. Mulheres obesas apresentam uma elevação maior de cortisol a

qual é mantida por um período maior quando comparadas aos homens obesos (CHAO et al., 2017; AL-SAFI et al., 2017).

Não houve alteração nos valores de creatinina sérica e hemoglobina nos indivíduos dos três grupos analisados. Esses parâmetros podem estar aumentados em pessoas obesas, principalmente do sexo masculino (BURTIS, ASHOOD e BRUNS, 2008).

Os parâmetros hematológicos leucometria total, porcentagem de neutrófilo e monócitos estavam dentro dos valores de referência nos indivíduos dos três grupos. A obesidade desencadeia um estado de inflamação crônica subclínica, denominado metainflamação ou inflamação metabólica, com aumento sérico de TNF- α , IL-6 e outros marcadores inflamatórios, além de um acúmulo de macrófagos no tecido adiposo. Porém, essa inflamação de baixo grau não é suficiente para aumentar periféricamente células tipicamente inflamatórias como neutrófilos e monócitos (DE MORAES et al., 2014).

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

A alimentação é um fator modulador da microbiota intestinal humana. Portanto, a adoção de uma alimentação balanceada e saudável na rotina é um fator importante para prevenir ou intervir em distúrbios, como a obesidade e doenças inflamatórias intestinais (DORÉ; BLOTTIÈRE, 2015).

O consumo de macronutrientes entre os participantes do estudo nos três grupos avaliados está de acordo com o esperado para a região sudeste do país (ARAUJO et al., 2013). O consumo de calorias e carboidratos foi maior pelos

indivíduos obesos quando comparados aos eutróficos. O consumo de lipídeos e proteínas foi semelhante nos três grupos. Entretanto, o consumo de fibras pelo grupo obeso foi estatisticamente maior quando comparado aos eutróficos.

A alimentação do brasileiro é baseada em alimentos altamente energéticos, e com baixo teor de nutrientes, ricos em açúcares e gorduras saturadas e pobres em fibras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; JAIME et al., 2011). Os carboidratos simples influenciam no índice glicêmico, que por sua vez estimula a lipogênese, aumentando o tamanho dos adipócitos. Assim, o índice glicêmico dos carboidratos é importante, pois pode induzir à obesidade e outras doenças relacionadas. O desequilíbrio na alimentação associado a outros fatores pode levar ao fenótipo obeso (ROSADO e MONTEIRO, 2001).

No nosso estudo 79,2% dos indivíduos do grupo obeso e 58,3% com sobrepeso consumiam menos calorias do que o recomendado diariamente com base nos cálculos de EER, cálculo feito a partir do questionário de frequência alimentar (QQFA), baseado na quantidade real de calorias ingeridas por cada indivíduo. A utilização de questionários de frequência alimentar para mensurar a quantidade de calorias ingeridas por um indivíduo é um fator complicador da veracidade dos dados, pois pacientes obesos tendem a informar valores de ingestão de energia fisiologicamente não compatíveis (BERNARDI, CICHELERO, VITOLO, 2005).

Não foi observada diferença significativa na qualidade dos alimentos consumidos pelos participantes dos três diferentes grupos. LOUZADA e colaboradores (2015), em seu estudo para avaliar o impacto que os alimentos ultraprocessados exercem sobre o perfil nutricional da dieta no Brasil, verificaram que o consumo médio diário de energia *per capita* foi de 1.866 kcal, sendo 69,5% proveniente de alimentos *in natura* ou minimamente processados, 9,0% de alimentos processados e 21,5% de alimentos ultraprocessados. Maior participação de alimentos ultraprocessados na dieta determinou generalizada deterioração no perfil nutricional da alimentação. Os indicadores do perfil nutricional da dieta dos brasileiros que menos consumiram alimentos ultraprocessados, com exceção do sódio, aproximam este estrato da população das recomendações internacionais para uma alimentação saudável. A porcentagem dos alimentos ultraprocessados

nos três grupos avaliados encontra-se bem próxima ao do estudo feito por LOUZADA e colaboradores (2015), para a população brasileira.

O aumento crescente do consumo de produtos processados e ultraprocessados são tidos como uma das causas do aumento da obesidade no Brasil (MOUBARAC e MONTEIRO 2013). Os alimentos ultraprocessados apresentam maior densidade energética, maior quantidade de açúcar livre e menor teor de fibras em relação aos alimentos *in natura* ou minimamente processados, e contém uma grande quantidade de conservantes para aumentar sua durabilidade. (LOUZADA et al, 2015). Alguns conservantes são substâncias ativas contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SAUCEDA, 2011). Portanto, poderiam interferir na homeostase da microbiota intestinal humana.

Os padrões estéticos vigentes e o fácil acesso à dietas não individualizadas através das mídias aumentam a adesão, principalmente das mulheres, a esse tipo de dieta, que podem ser inadequadas no que se refere à composição de macronutrientes para uma perda de peso saudável, logo, pode refletir também nos resultados de consumo de macronutrientes (LIMA et al., 2015). Devido a etiologia multifatorial da obesidade, é complicado mensurar a contribuição de cada variável envolvida no processo (CICHELERO e VITOLLO, 2005).

Neste estudo, uma grande quantidade de fungos filamentosos foi isolada de espécimes fecais de indivíduos eutróficos, quando comparado com os obesos. Considerando-se as limitações metodológicas da técnica, como por exemplo, avaliação de diversidade baseada em técnicas dependentes de cultivo, uma diversidade ligeiramente mais elevada de fungos filamentosos foi observada, ao contrário do demonstrado na maioria dos estudos, onde aproximadamente 40% dos taxons de fungos descritos no intestino são de leveduras. As leveduras representam 63,4 % dos fungos descritos em diversos estudos, e 10 dos 12 fungos mais comumente detectados são leveduras (EVERARD e CANI, 2013).

O fungo filamentoso *Paecilomyces* sp. foi o predominante em indivíduos eutróficos e com sobrepeso, enquanto que nos obesos, *Penicillium* sp. foi o mais isolado. De acordo com a literatura, *Penicillium* sp. é descrito não somente como o mais abundante em indivíduos obesos, mas também positivamente correlacionado com parâmetros inflamatórios. Alguns metabólitos de *Penicillium* sp. demonstraram

exibir atividades inflamatórias e de resistência à insulina (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Em outros estudos, cujo objetivo foi a descrição de fungos associados à microbiota intestinal, *Aspergillus* spp. é apontado como o fungo filamentosos mais comumente associado às doenças encontrado no intestino humano. Outros fungos filamentosos descritos no intestino de mamíferos também relacionados com doenças infecciosas são *Alternaria*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (SUHR E HALLEN-ADAMS, 2015).

Entretanto, pela técnica de hibridização *in situ* (FISH), foram detectadas mais leveduras do que fungos filamentosos nos três grupos avaliados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos. Nos experimentos de quantificação absoluta por qPCR foi observado um número maior de cópias de DNA de fungos por grama de fezes nos indivíduos obesos do que nos eutróficos. Portanto, o aumento de fungos pode estar associado a obesidade, porém não foi possível relacionar a forma celular predominante (levedura ou fungo filamentosos) a indivíduos obesos.

As observações quanto ao maior isolamento e diversidade de fungos entre indivíduos do sexo feminino, se comparadas aos do sexo masculino, nas metodologias dependentes de cultivo, estão de acordo com a literatura e podem estar relacionadas não apenas com a maior quantidade de mulheres participantes, mas também com a interferência de hormônios sexuais. Já está constatado que as diferenças nos hormônios sexuais podem modular a composição da microbiota, especialmente fungos, ao longo da dieta do hospedeiro de uma maneira dependente do sexo (STRATI et al., 2016).

Diversos táxons de fungos foram descritos neste trabalho pelas técnicas dependentes de cultivo. Considerando-se o número de participantes (n=72), o filo predominantemente isolado das amostras neste estudo foi o *Ascomycota* (17 gêneros diferentes), seguido por *Basidiomycota* (*Trichosporon* sp. e *R. mucilaginosa*) e *Zigomycota* (*Mucor* sp, *Rhizopus* sp. e *Syncephalastrum* sp.), sendo este último isolado somente em um indivíduo eutrófico. Foram detectadas 2,32 vezes mais DNA do filo *Ascomycota* em indivíduos eutróficos quando comparados aos obesos e 2,02 vezes mais quando comparados aos indivíduos com sobrepeso. Não foram observadas diferenças significativas no número de

cópias de DNA do filo Basidimycota entre os três grupos. Portanto, ocorre um predomínio do filo Ascomycota nos indivíduos eutróficos. Análise da interação fungo-fungo demonstrou que, em pacientes obesos, o filo Ascomycota correlacionou-se negativamente com os filios de Basidiomycota e Zygomycota (RODRÍGUEZ, 2015).

De acordo com a literatura, os fungos intestinais comensais pertencem aos filios Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota e Microsporidia, embora este último está associado a doenças intestinais humanas. No filo Zygomycota, membros da ordem Mucorales como *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia* já foram descritos no trato gastrintestinal humano. Ocorre predomínio dos filios Ascomycota e Basidiomycota na microbiota intestinal humana de indivíduos adultos saudáveis (HUSEYIN et al., 2017; SUHR et al., 2015). Mais de 48 gêneros de basidiomicetos diferentes foram detectados no tubo digestivo humano; enquanto que mais de 84 gêneros no filo *Ascomycota* foram descritos no mesmo local (HAMAD et al., 2016). Foi descrito um aumento da razão entre os filios Basidiomycota/ *Ascomycota* da microbiota intestinal de indivíduos com encefalomielite mialgica/ síndrome da fadiga crônica, uma doença sem causas ou mecanismos identificados, caracterizada por sintomas de fadiga profunda, dor, comprometimento cognitivo, mal-estar pós-esforço e inflamação (MANDARANO et al., 2018).

A levedura comensal mais comumente descrita no trato gastrintestinal é *Candida*, mas a disbiose bacteriana pode influenciar nesta levedura tornando-a patogênica, levando a candidíase e infecções disseminadas. Foi observado também aumento na proporção de fungos patogênicos oportunistas, incluindo *Candida*, em modelos de inflamação intestinal em camundongos (STRATI et al., 2016).

A quantificação de *C. albicans* pela técnica de FISH demonstrou uma maior concentração significativa desta levedura em indivíduos obesos, quando comparados aos eutróficos. A interação entre fungos e bactérias no ecossistema intestinal é pouco conhecida, entretanto, já foi descrita uma associação negativa entre *Candida* spp. e *Bacteroides* sp. (HOFFMANN et al., 2013; HUSEYIN et al., 2017; MUKHERJEE et al., 2015). Esta observação é particularmente interessante e relevante, uma vez que, de acordo com a mudança da microbiota durante a obesidade, o aumento da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* já está bem

estabelecido (PAULA, 2016; EVERARD e CANI, 2013). Em nosso estudo, uma vez que os indivíduos obesos parecem estar associados a contagens de leveduras mais elevadas, é razoável sugerir que este aumento da contagem de fungos esteja de acordo com a menor quantidade de *Bacteroidetes* que se espera encontrar na obesidade, já avaliado nos mesmos pacientes em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (PAULA, 2016).

As leveduras do gênero *Candida* spp. estão associadas à microbiota intestinal de humanos saudáveis, embora alguns estudos sugerem uma associação entre o aumento dessa levedura e diabetes, além de distúrbios inflamatórios no intestino, com um possível papel ativo de *C. albicans* nesse processo (RODRÍGUEZ et al., 2015). Nossos dados não só apontam diferenças entre a densidade de *C. albicans* nos indivíduos obesos pela técnica de FISH, mas também predominância de *C. parapsilosis* em indivíduos obesos e com sobrepeso pela técnica de cultivo, a qual deve ser investigada quanto ao seu papel no processo da obesidade, já que não existem estudos associando outras espécies de *Candida* sp. a essa enfermidade.

Através dos métodos dependentes de cultivo foi possível verificar a alta frequência da levedura *Trichosporon* sp. em indivíduos eutróficos. Essas leveduras do filo *Basidiomycota* estão presentes no ambiente e podem colonizar os tratos gastrintestinal e urinário, as vias respiratórias e a pele de seres humanos. São agentes etiológicos da Piedra Branca e patógenos oportunistas causadores de infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, relacionados a infecções nosocomiais (DE ALMEIDA et al., 2016). A levedura *Rhodotorula* sp. foi frequentemente isolada de espécimes fecais de indivíduos obesos e com sobrepeso neste estudo. Apesar da ecologia ubiquitária de *Rhodotorula* spp., essas leveduras estão se tornando altamente relacionadas a pacientes com anormalidades metabólicas (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Através da técnica de PCR-DGGE, foi possível agrupar os indivíduos em dois *clusters*, sendo o primeiro *cluster* formado majoritariamente por indivíduos eutróficos e com sobrepeso, 67% e 54%, respectivamente, e o segundo *cluster* por indivíduos obesos (67% dos indivíduos deste grupo presentes neste *cluster*). Portanto, existe um grupo comum de fungos presentes nos indivíduos obesos que podem estar influenciando no fenótipo obeso. Entretanto, não foi verificada

diferenças na variável riqueza entre os três grupos. RODRÍGUEZ e colaboradores (2015), descreveram o agrupamento dos indivíduos obesos de acordo com os gêneros de fungos encontrados, com alta abundância dos gêneros *Aspergillus* e baixa abundância dos gêneros *Mucor*, *Penicillium*, *Saccharomyces* e *Eupenicillium* contribuindo para a obesidade e não observaram diferenças entre a riqueza das comunidades fúngicas de indivíduos obesos e não obesos, assim como em nosso estudo (RODRÍGUEZ et al. 2015).

Os estudos realizados na última década demonstram que os fungos apresentam uma função complexa e multifacetada no trato gastrointestinal, influenciando diretamente na saúde e doença do hospedeiro, através de interações com as bactérias, com outros fungos e com o hospedeiro (CHU et al, 2018; HUSEYIN et al, 2017; MUKHERJEE et al., 2015). Os fungos representam o mais abundante grupo de eucariotos residentes no intestino humano, com implicações na manutenção da saúde e desenvolvimento de doenças em seres humanos (CHU et al, 2018; HAMAD et al., 2016; HUSEYIN et al, 2017; MUKHERJEE et al., 2015).

Apesar da baixa quantidade de fungos no intestino, eles influenciam na resposta imune do hospedeiro, com diminuição do processo inflamatório. Os fungos também podem influenciar na composição da comunidade bacteriana. Estas observações sugerem que os fungos são espécies-chave, isto é, organismos que têm impactos ecológicos que superam em muito a sua representação numérica na comunidade. Evidências sugerem que fungos cumprem este papel no ecossistema intestinal (HOFFMANN et al., 2013; KUMAMOTO, 2016).

Apesar do reconhecimento da interação entre os fungos da microbiota intestinal e o hospedeiro, pouco se sabe sobre as condições do hospedeiro que poderiam influenciar na composição da comunidade fúngica, assim como a obesidade. Enquanto já é amplamente reconhecido que a microbiota bacteriana está sujeita a influência da idade, índice de massa corporal, tipo de parto, amamentação, dieta, etnia, condições ambientais, assim como pH, oxigênio, nutrientes e ácidos biliares presentes no intestino, torna-se razoável considerar que essas condições adversas também poderiam influenciar a micobiota (EVERARD e CANI, 2013; WALKER et al., 2014). Neste contexto, a obesidade é considerada uma doença pandêmica, estreitamente relacionada com a microbiota intestinal e características como o tipo de alimentação, estado fisiológico e estilo de vida

(WHO, 2000). Alterações da microbiota intestinal e seus metabólitos são esperados na fisiologia de indivíduos obesos (EVERARD e CANI, 2013; WALKER et al., 2014).

O resultado obtido nas análises de correlação confirma a relação entre o aumento de fungos, e também a presença de determinados fungos (*cluster 2 DGGE*) com parâmetros envolvidos em distúrbios metabólicos e maior consumo de alimentos ricos em fibras e carboidratos. A correlação entre a presença de fungos e os parâmetros descritos associados com síndrome metabólica já foram verificados, demonstrando que os fungos podem fazer parte da microbiota intestinal residente e estarem relacionados à obesidade (RODRIGUEZ et al., 2015). Estudos demonstraram também uma correlação positiva entre o maior consumo de carboidratos e o aumento de fungos, principalmente *C. albicans* (RODRIGUEZ et al., 2015; SAM et al., 2017; STEFANAKI et al. 2017).

De acordo com a literatura, poucos estudos têm caracterizado o microbioma do trato gastrintestinal em indivíduos saudáveis utilizando metodologias independentes de cultivo e com um número amostral de indivíduos muito pequeno. Através do pirosequenciamento do metagenoma fecal de 10 voluntários saudáveis, seis gêneros de fungos foram descritos (DOLLIVE et al., 2012). Por outro lado, utilizando análises de sequenciamento de alto rendimento para avaliar o efeito da dieta nas comunidades microbianas da microbiota intestinal, foi observada a presença de 12, 15 e cinco gêneros de fungos, bactérias e arqueias, respectivamente (HOFFMANN et al., 2013).

Recentemente, foram analisadas 313 vezes de indivíduos saudáveis no projeto microbioma intestinal humano para avaliação da micobiota intestinal por análise de sequenciamento da região IT2. A diversidade fúngica foi muito menor quando comparada a diversidade bacteriana. As leveduras predominaram, representando oito dos 15 gêneros mais abundantes. As comunidades fúngicas foram caracterizadas pela alta prevalência (acima de 80%) de *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia restricta* e *Candida albicans* (NASHA et al., 2017). O primeiro estudo avaliando micobiota intestinal e tipo de parto revelou que diferentemente da microbiota bacteriana intestinal, este fator não altera significativamente a composição fúngica intestinal do recém-nascido (WARD et al., 2018). Até o momento, existem poucos estudos voltados para avaliação de fungos

da microbiota intestinal, especialmente estudos comparando diferenças fisiológicas do hospedeiro, como indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos (MUKHERJEE et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2015).

É bem aceito que o desequilíbrio do ecossistema intestinal possa contribuir para várias doenças. Por exemplo, embora o tratamento antibacteriano possa ser utilizado para tratar uma infecção, resulta na inibição do crescimento de certos membros da microbiota, alterando a composição da comunidade, a qual pode tornar-se vulnerável à invasão por um novo microrganismo patogênico. Da mesma forma, a resposta inflamatória do hospedeiro a um patógeno recém introduzido poderia reduzir os concorrentes dentro do nicho, favorecendo a invasão pelos patógenos putativos para a comunidade. Em pacientes que sofrem de doença inflamatória intestinal, a disbiose, um desequilíbrio na composição da comunidade microbiana, é freqüentemente observada (KUMAMOTO, 2016). A relação da microbiota intestinal na modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro tem sido atualmente reconhecida e caracterizada, possibilitando assim o surgimento de novas terapias para tratamento de transtornos neurológicos e psiquiátricos associados a modulação da microbiota intestinal (ENAUD et al., 2018).

Considerando todas as limitações em relação a uma abordagem dependente de cultivo, neste estudo, uma coleção de mais de 800 amostras de fungos está disponível para estudos adicionais futuros de ecologia e biologia microbiana, para abordar melhor as várias questões relativas à microbiota humana. Embora a diversidade e a função da microbiota bacteriana do cólon foram bem caracterizadas, pouco se sabe sobre o micobioma no intestino grosso humano e nas fezes (CUI et al., 2013). Uma das limitações dos métodos tradicionais de cultura bacteriológica e micológica foi recentemente superado por avanços nas técnicas de espectrometria de massa, que podem identificar com precisão e rapidamente microrganismos pela técnica de MALDI-TOF, permitindo rápida identificação de grande número de colônias (MORALES, BRIGNARDELLO E GOTTELAND, 2010). Neste estudo, combinamos técnicas de espectrometria de massa com conhecidos e novos métodos de cultura, além dos métodos moleculares para o estudo do micobioma intestinal humano de indivíduos obesos e com excesso de peso.

Embora pouco se sabe sobre a ecologia dos fungos durante a obesidade, podemos sugerir, como observado para outras condições metabólicas, que a alteração da microbiota pode interferir na diversidade de fungos. Mesmo considerando uma visão panorâmica da diversidade de fungos no intestino humano comparando diferentes grupos de indivíduos, são necessários novos estudos prospectivos para melhor abordar o papel dos fungos pertencentes a microbiota intestinal em indivíduos obesos e com excesso de peso.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificados trinta e quatro gêneros e/ou espécies de fungos como pertencentes a microbiota intestinal humana por metodologias dependentes de cultivo. O filo predominante foi o Ascomycota. Foram encontrados 2 fungos do filo Basidiomycota e 3 do gênero Zigomycota. A diversidade de fungos filamentosos encontrada nos três grupos de estudo foi maior do que a de leveduras. Os indivíduos do sexo feminino apresentam maior diversidade de fungos quando comparados com os indivíduos do sexo masculino. A estrutura da microbiota intestinal tende a se diferenciar entre indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos, sendo menos semelhante entre os obesos e eutróficos, por análise metagenômica.

Os indivíduos eutróficos apresentaram uma maior quantidade de fungos filamentosos que os indivíduos obesos. O gênero *Paecilomyces* foi o predominante no grupo dos indivíduos eutróficos. Existe uma correlação positiva entre *C. parapsilosis* e porcentagem de proteína da dieta no grupo dos indivíduos eutróficos. A levedura *C. albicans* está presente em maior quantidade nos indivíduos obesos quando comparados aos indivíduos eutróficos.

O gênero *Penicillium* foi o predominante no grupo dos indivíduos nos indivíduos obesos. Os indivíduos obesos apresentam um número maior de cópias de DNA de fungos. Existe uma correlação positiva entre os fungos *Penicillium* sp. e *Fonsecaea* e porcentagem de carboidratos da dieta no grupo dos indivíduos obesos.

A correlação entre os fungos e os parâmetros bioquímicos e nutricionais revelou que nos indivíduos obesos há uma correlação positiva entre os fungos (fungos totais, leveduras e *C. albicans*) e todos os parâmetros antropométricos avaliados, colesterol total, LDL, triglicerídeos, hemoglobina, HOMA-IR, HOMA- β , insulina, glicose sérica, creatinina e porcentagem de fibras e carboidratos da dieta. O grupo dos indivíduos eutróficos e com sobrepeso apresentou correlação positiva entre os parâmetros porcentagem de lipídeos e proteínas da dieta e HDL.

Outros estudos são necessários para entender melhor a relação causal entre a microbiota intestinal e a obesidade. Esse conhecimento poderá ser utilizado na modulação da glicemia e no tratamento da obesidade no futuro.

REFERÊNCIAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010/ABESO**-Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 2009.

ALKASIR, Rashad et al. Human gut microbiota: the links with dementia development. **Protein & Cell**, p. 1-13, 2016.

AL-SAFI, Z. A. et al. Evidence for disruption of normal circadian cortisol rhythm in women with obesity. **Gynecological Endocrinology**, p. 1-5, 2017.

ALVEZ, M. N. R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 21, n. 4, p. 316-9, 2006.

APOLONIO, A. N. M., MACHADO, A. B. F. **Microbiologia Bucal e Aplicada**. 1. Ed. Editora Guanabara Koogan: 2018.

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

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

BERVOETS, Liene et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 10, 2013.

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

BORGES, F.M.; DE PAULA, T.O.; GAMEIRO, J.; DA SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. O papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre microbioma intestinal e obesidade. **HU Revista**, v.40, n. 1 e 2, p.109-118, 2014.

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

BRANDT, K. G. et al. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**. São Paulo, v. 28, n. 2, p.117-127, 2006.

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

BRASIL, Ministério da saúde. **Vigitel Brasil 2016**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2017.

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

CHAO, A. M. et al. Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: Prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight. **Obesity**, v. 25, n. 4, p. 713-720, 2017.

CHEN, Y. et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York v. 70, n. 4, p. 492-498, ago. 2011.

CHIARO, Tyson R. et al. A member of the gut microbiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice. **Science translational medicine**, v. 9, n. 380, p. eaaf9044, 2017.

- CHU, Yi et al. Inflammatory Bowel Disease's Specific Changes of Enteric Mycobiota and Virome. **Journal of digestive diseases**, 2017.
- CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. The impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. **Cell**, v.1, n.48, p.1258-1270, 2012.
- CROXATTO, A.; PROD'ROM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI – TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v.36, p.380-407, 2012.
- CUI, L.; MORRIS, A.; GHEDIN, E. The human mycobiome in health and disease. **Genome Med**, v.5, p.1-12, 2013.
- DAVE, M.; HIGGINS, P. D.; MIDDHA, S.; RIOUX, P. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 246-257, jun. 2012.
- DE ALMEIDA JÚNIOR, João N.; HENNEQUIN, Christophe. Invasive Trichosporon infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1629, 2016.
- DE OBESIDADE, Diretrizes Brasileiras. 2010/ABESO–**Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica**. 2009.
- DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual review of nutrition**, v. 31, p. 15-31, aug. 2011.
- DENMAN, Stuart E.; MCSWEENEY, Christopher S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS microbiology ecology**, v. 58, n. 3, p. 572-582, 2006.
- DEVARAJ, S.; HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 4, p. 617-628, feb. 2013.

DIBAISE, J.K.; ZHANG, H.; CROWELL, M.D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G.A.; RITTMANN, B.E. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, Oxford, v.83, n.4, p.460-469, 2008.

DOLLIVE, Serena et al. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. **Genome biology**, v. 13, n. 7, p. R60, 2012.

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

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

ENAUD, R. et al. The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 22, 2018.

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

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

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

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

- FONTAINE, K. R.; BAROFSKY, I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity Reviews**. v. 2, p. 173-182, aug. 2001.
- FRANCISCHI, R. P. P.; PEREIRA, L. O.; FREITAS, C. S.; SANTOS; VIEIRA, P. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 17-28, jan./abr., 2000.
- GALVÃO, R; KOHLMANN, O. J. Hipertensão arterial no paciente obeso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9, n. 3, p. 262-7, jun. 2002.
- GOUBA, N.; DRANCOURT, M. Digestive tract mycobiota: A source of infection. **Médecine et maladies infectieuses**, v.45, p.9-16, 2015.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Reviews Immunology*. N. 29, p, 415-445, jan. 2011.
- HALLEN-ADAMS, Heather E.; SUHR, Mallory J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. **Virulence**, p. 1-7, 2016.
- HALWACHS, Bettina et al. Critical issues in mycobiota analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- HAMAD, Ibrahim; RAOULT, Didier; BITTAR, Fadi. Repertory of eukaryotes (eukaryome) in the human gastrointestinal tract: taxonomy and detection methods. **Parasite immunology**, v. 38, n. 1, p. 12-36, 2016.
- HAN, Jonathan M.; LEVINGS, Megan K. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 2, p. 527-532, 2013.
- HERDER, C.; SCHNEITLER, S.; RATHMANN, W.; HAASTERT, B.; SCHNEITLER, H.; WINKLER, H.; BREDAHL, R.; HAHNLOSER, E.; MARTIN, S. Low-grade, obesity, and insulin resistance in adolescents. **The Journal of Clinical and Endocrinology & Metabolism.**, v.92, p. 4569-4574, jul. 2013.
- HOFFMANN, Christian et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66019, 2013.

- HOGARDT, Michael et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 2, p. 818-825, 2000.
- HUSEYIN, C. E. et al. Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. **FEMS microbiology reviews**, p. fuw047, 2017.
- ILIEV, Iliyan D.; LEONARDI, Irina. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 10, p. 635, 2017.
- KAHAN, B.B.; FLIER, J.S., 2000. Obesity and insulin resistance. **Journal of clinical investigation**, n. 106 v. 4, p.473-481, aug. 2000.
- KAIN, J.; CORDERO, S. H.; PINEDA, D.; MORAES, A., F.; ANTIPOSTA, D. COLLESE, T.; FORKERT, E. C. O.; GONZALEZ, L.; MIRANDA, J. J.; RIVERA, J. Obesity Prevention in Latin America. **Current obesity Reports**, V. 3 P. 150–155, mar. 2014.
- KIM, Y. et al. Gut Dysbiosis Promotes M2 Macrophage Polarization and Allergic Airway Inflammation via Fungi- Induced PGE2. **Cell Host and Microbes**, Cambridge, v.15, no. 1, p. 95-102, jan. 2014.
- KOLECKA, A.; KHAYHAN, K.; GROENEWALD, M.; THEELEN, B.; ARABATZIS, M.; VELEGRAKI, A.; KOSTRZEWA, M.; MARES, M.; ALDEEN, S.J.T.; BOEKHOUT, T. Identification of Medically Relevant Species of Arthroconidial Yeasts by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.8, p.2491-2500, 2013.
- KORECKA, A.; ARELAMPALAM, V. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator?, **Journal of oral microbiology**, v. 4, jan. 2012.
- KUMAMOTO, Carol A. The Fungal Mycobiota: Small Numbers, Large Impacts. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 6, p. 750-751, 2016.
- LAGE, D. G.; BRITO, G. A. P. A Relação Da Microbiota Intestinal Com Obesidade E Resistência À Insulina. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.6, n.31, p.31-34, Jan/Fev. 2012.

- LI, Qiurong et al. Use of 18S ribosomal DNA polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis to study composition of fungal community in 2 patients with intestinal transplants. **Human pathology**, v. 43, n. 8, p. 1273-1281, 2012.
- LIMA, A.V L., FERNANDES, C.D.M.F.F., SALES, B.R.O., LIMA, M.E.R.. Teor Calórico e de macronutrientes de dietas veiculadas em revistas femininas não científicas impressas. **Revista Interdisciplinar**, V.8, n.4, p.135-142. Out. 2015.
- LIMON, Jose J.; SKALSKI, Joseph H.; UNDERHILL, David M. Commensal fungi in health and disease. **Cell host & microbe**, v. 22, n. 2, p. 156-165, 2017.
- LIU, Cindy M. et al. FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 255, 2012.
- LOUZADA, M. L. C. et al. Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, 2015.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 117, n. 1. p. 175–184, jan., 2007.
- MANCO, M.; FERNANDEZ-REAL, J. M.; EQUITANI, F.; VENDRELL, J.; VALERA MORA, M. E.; NANNI, G.; TONDOLO, V.; CALVANI, M.; RICART, W.; CASTAGNET, M.; MINGRONE, G. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, V. 92, N. 2, P. 483-490, jul. 2007.
- MANDARANO, A. H. et al. Eukaryotes in the gut microbiota in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. **PeerJ**, v. 6, p. e4282, 2018.
- MOKDAD, A. H.; FORD, E.S.; BOWMAN, B. A.; DIETZ, W. H.; VINICOR, F.; BALES, V. S.; MARKS, J. S. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. **Jama**. v. 289, p.76-79, 2003.

MORALES, P.; BRIGNARDELLO, J.; GOTTELAND, M. The association of intestinal microbiota with obesity. **Revista medica de Chile**, v. 138, n. 8, p. 1020-1027, 2010.

MOTOOKA, Daisuke et al. Fungal ITS1 deep-sequencing strategies to reconstruct the composition of a 26-species community and evaluation of the gut mycobiota of healthy Japanese individuals. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

MUKHERJEE, P. K.; SENDID, B.; HOARAU, G.; COLOMBEL, J. F.; POULAIN, D.; GHANNOUM, M. A. Mycobiota in gastrointestinal diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.12, p.77-87, 2015.

MUKHERJEE, Pranab K. et al. Mycobiota in gastrointestinal diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 2, p. 77-87, 2015.

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

NASH, Andrea K. et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 2017.

NICHOLSON, Jeremy K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.

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

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

OTT, Stephan J. et al. Fungal rDNA signatures in coronary atherosclerotic plaques. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 12, p. 3035-3045, 2007.

PAULA, Thaís Oliveira de. **Diversidade bacteriana intestinal e parâmetros nutricionais de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos**. 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)—Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

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

PISA, Diana et al. Different brain regions are infected with fungi in Alzheimer's disease. **Scientific reports**, v. 5, p. 15015, 2015.

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

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

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

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

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

RODRÍGUEZ, M. Mar et al. Obesity changes the human gut mycobiome. **Scientific reports**, v. 5, p. 14600, 2015.

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

SAM, Q.H.; CHANG, M. W.; CHAI, L. Y. A. The fungal mycobiome and its interaction with gut bacteria in the host. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 330, 2017.

SCUPHAM, A. J.; PRESLEY, L.L.; WEI, B.; BENT, E.; GRIFFITH, N.; MCPHERSON, M.; ZHU, F.; OLUWADARA, O.; RAO, N.; BRAUN, J.; BORNEMAN, J. Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.793–801, 2006.

SCUPHAM, Alexandra J. et al. Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 793-801, 2006.

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

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

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

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

SOUZA, C.A.I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arq. Inst. Biol**, v.67, n.2, p.275-281, jul./dez., 2000.

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

STEFANAKI, Charikleia et al. Examining the gut bacteriome, virome, and mycobiome in glucose metabolism disorders: Are we on the right track?. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 73, p. 52-66, 2017.

STRATI, Francesco et al. Altered gut microbiota in Rett syndrome. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 41, 2016.

SUHR, Mallory J.; HALLEN-ADAMS, Heather E. The human gut mycobiome: pitfalls and potentials—a mycologist’s perspective. **Mycologia**, v. 107, n. 6, p. 1057-1073, 2015.

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

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

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

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

UNDERHILL, D.M.; ILIEV, I.D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nat Rev Immunol**, v.14, n.6, p.405-416, 2014.

VAINIO, Eeva J.; HANTULA, Jarkko. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological research**, v. 104, n. 8, p. 927-936, 2000.

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

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

WALKER, Alan W. et al. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 5, p. 267-274, 2014.

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

WARD, T. L. et al. Development of the Human Mycobiome over the First Month of Life and across Body Sites. **Clinical Science and Epidemiology**, v. 3, n. 3, p. e00140-17, 2018.

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

WITHERDEN, E. A. et al. The Human Mucosal Mycobiome and Fungal Community Interactions. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 56, 2017.

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

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

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

XU, Wei; PANG, Ka-Lai; LUO, Zhu-Hua. High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean. **Microbial ecology**, v. 68, n. 4, p. 688-698, 2014.

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

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

APÊNDICE A – Ficha de identificação macroscópica dos fungos

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DOS FUNGOS – MICROBIOTA HUMANA INTESTINAL

Nº AMOSTRA: () Obeso () Eutrófico

Nº DUPLICATA:

Qtde de colônias diferentes: _____ Qtde leveduras: _____ Qtde filamentosos: _____

Características macromorfológica –
Leveduras

Verso

Cor: () branca () creme () laranja
() vermelha () marrom () preta

Outra: _____

Aspecto: () lisa () rugosa ()
cerebriforme () úmida () cremosa ()
pastosa

Outra: _____

Reverso

Cor: () branca () creme () laranja
() vermelha () marrom () preta

Aspecto: () lisa () rugosa ()
cerebriforme

Outra: _____

Gêneros

suspeitos: _____

APÊNDICE B- Artigos publicados

O papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre microbioma intestinal e obesidade

Francis Moreira Borges*
Thaís Oliveira de Paula**
Jacy Gameiro***
Vânia Lúcia da Silva****
Cláudio Galuppo Diniz*****

RESUMO

Os fungos apresentam papel importante na saúde humana, sendo componentes da microbiota humana de diversos sítios anatômicos como, por exemplo, pele, cavidade bucal, trato gastrointestinal e trato geniturinário. São também agentes etiológicos de várias infecções, desde micoses superficiais até sistêmicas. Os fungos participam na regulação do sistema imunológico, podendo promover o surgimento de alergias das vias aéreas superiores. Estão presentes na composição da microbiota intestinal, formando o microbioma. Portanto, seu papel no desenvolvimento da obesidade deve ser considerado, atuando tanto na modulação da resposta imune local quanto através de sua interação com os demais microrganismos da microbiota intestinal. Este trabalho tem como objetivo revisar aspectos da participação microbiana na etiopatogenia da obesidade e discutir a participação dos fungos no microbioma intestinal, sua relação com a obesidade e as perspectivas futuras, com a utilização de metodologias moleculares, para um melhor entendimento do papel dos fungos na microbiota intestinal na saúde e na doença.

Palavras-chave: Microbiota. Fungos. Obesidade

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pelo aumento do índice de massa corporal (IMC), constituindo uma síndrome metabólica de causa multifatorial. Indivíduos com $IMC \geq 25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ são considerados como sobrepeso e indivíduos com $IMC \geq 30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ são classificados como obesos. Biologicamente, é considerada como sendo o acúmulo de adipócitos nos tecidos, devido ao elevado índice de massa corporal (BERNHARD et al., 2013).

Desde 1997 a organização mundial da saúde vem alertando para uma crescente epidemia de obesidade nos países desenvolvidos, a qual levaria um maior risco de desenvolvimento de doenças não infecciosas relacionadas à obesidade (PRENTICE et al., 2006) (DIBAISE et al., 2008). Atualmente a obesidade pode ser considerada uma pandemia (PRENTICE et al., 2006), pois atinge tanto as populações dos países desenvolvidos quanto dos em desenvolvimento,

sendo destacada como um problema de saúde pública mundial (TORRES-FUENTES et al., 2013).

Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou uma pesquisa que revela que pela primeira vez mais da metade (52%) da população brasileira apresentava 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 2012 na população acima de 18 anos de idade (BRASIL, 2013).

A obesidade infantil e o sobrepeso já atingem números alarmantes em muitos países. (BERVOETS et al., 2013). Dados da Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde demonstram que 33% da população adulta dos Estados Unidos é obesa e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (DIXIT, 2008). É comum que as crianças obesas apresentem maior risco para desenvolvimento de comorbidades relacionadas ao excesso de massa

* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG. E-mail: francismborges@gmail.com.

** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

*** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

**** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

***** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Juiz de Fora, MG.

corporal, como por exemplo, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares prematuras (DIBAISE et al., 2008). Outros agravos à saúde também podem estar relacionados ao ganho excessivo de peso, doenças como hipertensão pulmonar, apnéia do sono, distúrbios gastroesofágicos, distúrbios musculares e até câncer (DIBAISE et al., 2008).

A inflamação crônica de baixo grau é a característica marcante de indivíduos obesos, que possuem maiores níveis de citocinas inflamatórias circulantes (BOSELO; ZAMBONI, 2000). O tecido adiposo dos obesos se torna um sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos do tipo M1, que secretam grandes quantidades de citocinas inflamatórias e quimioquinas que atraem um maior número de células inflamatórias, aumentando assim os níveis destas moléculas, que contribuem ativamente para a inflamação sistêmica nestes indivíduos (Haddad; Saade; Safieh-Garabedian, 2002). Estas pessoas podem apresentar níveis alterados de leptina, hormônio relacionado com a saciedade, mas também descrito como importante indutor de respostas inflamatórias do tipo Th1 (ZHAO et al., 2003) (Bernotiene; Palmer; Gabay, 2006) (LAM; LU, 2007).

Além do status imunológico alterado, é sugerido que a composição bacteriana (espécies e abundância) da microbiota intestinal seja única para cada indivíduo (TILG; Kaser, 2011). Por outro lado, alguns autores propõem o conceito de um núcleo microbiano comum entre os diferentes hospedeiros, entretanto, esta proposição tem sido questionada visto que, espécies de núcleo anteriormente proposto podem representar menos de 1% do total de componentes da microbiota intestinal em alguns indivíduos semelhantes (Backhed et al., 2004). Apesar da grande variabilidade na composição de espécies (microbiota), os perfis genéticos funcionais (microbiomas) são semelhantes em indivíduos saudáveis. No entanto, essa redundância funcional pode refletir convergência evolutiva de táxons não relacionados, culminando em dificuldades na compreensão do que constitui a variação saudável ou patológica na estrutura da comunidade microbiana (Duncan et al., 2008) (Delzene; CANI, 2011).

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena. Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC,

como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura foi realizada por meio do levantamento de dados encontrados nas bases de dados NCBI – PubMed, Scielo, Periódicos Capes e Science Direct. Foram consultados artigos originais e de revisão sobre o tema: Papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre microbioma intestinal e obesidade, utilizando os descritores: microbioma, microbiota intestinal e obesidade. O tempo para análise dos artigos foi de três meses e foram escolhidos os mais relevantes em relação ao tema.

2.1 Obesidade, aspectos clínicos e epidemiológicos

A epidemia mundial de obesidade está suscitando esforços para identificar fatores ambientais e do hospedeiro que afetam o balanço energético (TURNBAUGH et al., 2006). Dentre os fatores ambientais relacionados ao aumento do índice de massa corporal, podem ser destacadas as profundas mudanças nos padrões alimentares mundiais e o custo relativo dos alimentos, responsável pelas transições nos hábitos alimentares (PRENTICE et al., 2006). Alimentos de maior valor energético são consumidos com maior frequência e em maior quantidade. A composição qualitativa e quantitativa da dieta diária varia consideravelmente de refeição para refeição e também de um dia para o outro, levando a variações das taxas metabólicas (EVERARD; CANI, 2013). Fatores genéticos e hábitos como fumo e prática de atividade física regular podem influenciar de forma significativa o aumento ou a redução da massa corporal em cada indivíduo (DIBAISE et al., 2008) (VAEL, et al., 2011) (Torres-Fuentes et al., 2013).

Biologicamente, a obesidade é definida como um excesso de adipócitos, correlacionados com índice de massa corporal (IMC), sendo caracterizada como síndrome metabólica de causa multifatorial, com participação de hormônios, neuropeptídeos e citocinas. Assim, a obesidade tem conseqüências sobre o eixo neuro-imuno-endócrino (Dixit, 2008) (Moller; Kaufman, 2005). O hipotálamo é o alvo de vários sinais transmitidos periféricamente e também de circuitos neuronais que controlam o balanço

energético e a massa corporal (Williams; Harrold; Cutler, 2000). Por volta de 1940, foi sugerido que alguns núcleos hipotalâmicos podem ser centros reguladores do apetite (hipotálamo lateral) e da saciedade (hipotálamo ventro-medial). A área delimitada pelo núcleo arqueado (ARC), situado perto da base do terceiro ventrículo e imediatamente acima da eminência mediana, é um dos chamados “órgãos circunventriculares”, nos quais a barreira hematoencefálica é modificada especialmente para permitir a entrada de peptídeos e proteínas circulantes, como leptina e insulina, que são considerados sinalizadores da massa corporal. Foi descoberto recentemente que a região ventromedial do hipotálamo é o alvo principal da leptina, que age neste local inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (WILLIAMS, 2001), através de circuitos neuronais que possuem moléculas sinalizadoras orexígenas (leptina) e anorexígenas (grelhina), como o neuropeptídeo Y (NPY), galanina, orexina, dentre outros (DIXIT, 2008) (Sahu, 2003).

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm relacionado o sistema neuroendócrino ao sistema imunológico, estudando a interação dos hormônios, células, neuropeptídeos e citocinas na fisiologia dos sistemas e na resposta imunológica (Velloso; Savino; Mansour, 2009) (Dardenne, 2009). Por exemplo, uma inflamação periférica estimula a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que por sua vez regula a resposta ao stress através da produção de hormônio adenocorticotrófico (ACTH), este hormônio promove a síntese e a liberação de glucocorticóides, os quais tem potente ação anti-inflamatória, diminuindo as respostas imunológicas tanto humorais quanto celulares (La Cava; Matarese, 2004). Ainda, existem mediadores comuns entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune, como IL-1, IL-6 e TNF- α , que atuam modulando a inflamação através do eixo hipotálamo- pituitária- adrenal (HPA) (Turnbull; Rivier, 1999) (HADDAD; SAADE; SAFIEH-GARABEDIAN, 2002).

O tecido adiposo tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir diversos hormônios e moléculas sinalizadoras, como a leptina, a qual tem função de regulação do sistema imune, pois está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular, a adipocitocina, atuando como protetor contra a inflamação e as interleucinas secretadas pelos adipócitos (IL-6 e IL-8). A leptina ativa linfócitos T, aumenta a resposta Th1, ativa monócitos, entre outros. Portanto a leptina pode ser considerada uma citocina pró-inflamatória (ALVEZ, 2006).

A inflamação do tecido adiposo ocorre como uma consequência da obesidade, caracterizada pela

infiltração e ativação de células do sistema imune, elevando a síntese de citocinas e quimiocinas. Esta inflamação crônica contribui com os mecanismos de indução da resistência a insulina e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. Vários estudos buscam identificar as subpopulações de células imunológicas que estão envolvidas no processo inflamatório do tecido adiposo, compreender os mecanismos que levam a inflamação deste tecido e desenvolver imunoterapias para reverter este processo (HAN; LEVINGS, 2013). O aumento nos níveis de leptina circulante, um dos principais hormônios associados à obesidade, juntamente a resistência central a este hormônio relacionada com os níveis reduzidos de grelina e adipocitocina estão relacionadas com o processo inflamatório observado na obesidade (SIEGMUND et al., 2002).

Além disso, vários fatores como idade, estilo de vida, alimentação, influenciam a composição da microbiota intestinal. A mudança na dieta é um fator promissor na terapêutica da obesidade, por ser um meio de fácil intervenção (BRANDT et al., 2006). Numerosos estudos utilizando modelos animais e humanos demonstraram que a microbiota pode influenciar a homeostase energética do hospedeiro por de vários mecanismos (Qin et al., 2010). Porém, estudos adicionais, de caráter regional ainda são necessários para uma compreensão mais detalhada da relação entre a composição microbiota intestinal e os variados fenótipos metabólicos como a obesidade, e de como uma modulação destes microrganismos poderia ser benéfica para alteração destes fenótipos.

Neste sentido é aceito que as bactérias da microbiota intestinal contribuem para a maturação do sistema imune e diminuição de possíveis reações alérgicas (BRANDT et al., 2006) (MAZMANIAN et al., 2005), porém não é conhecida a relação da microbiota fúngica intestinal com a modulação do sistema imune do hospedeiro (CUI et al., 2013)

2.2 Implicações da microbiota intestinal no desenvolvimento e manutenção da obesidade

A microbiota intestinal humana é constituída por uma grande quantidade de microrganismos distribuídos de maneira não homogênia, de acordo com as características de cada porção intestinal, sendo o colón a parte que alberga 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 (Villela, 2004) (QIN et al., 2010). Estima-se que a microbiota intestinal contenha

cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (FLINT, 2011).

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 gastrintestinal (CUI et al., 2013).

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 de uma resposta imune e geração de uma imunotolerância; metabolismo de drogas; favorecimento do desenvolvimento de microvilosidades e importantes funções metabólicas (Villela, 2004) (TAGLIABUE; ELLI, 2013) (DIBAISE et al., 2008) (Turnbaugh, 2006).

Somente nos últimos dez anos, no entanto é que o microbioma humano como um novo conceito microbiológico, o qual engloba a pesquisa de todos os microrganismos (bactérias, fungos, arqueias e vírus) como componentes da microbiota de um determinado sítio anatômico, vêm sendo considerado. Essa conotação mudou em 2010, quando o termo micobioma (uma combinação das palavras micologia e microbioma) foi utilizado pela primeira vez para se referir ao microbioma fúngico (CUI et al., 2013). Existem diversas razões para incluir o estudo da participação dos fungos na constituição da microbiota das diferentes partes do corpo. Alguns fatores reforçam esta mudança: (I) a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas duas últimas décadas, principalmente as oportunistas, com o crescimento do número de pacientes imunossuprimidos, infectados pelo vírus HIV, transplantados ou em quimioterapia para câncer; (II) doenças que eram consideradas como não associadas a fungos, hepatite, fibrose cística e doenças intestinais inflamatórias, hoje parecem estar relacionadas ao micobioma de determinados locais e (III) a interação entre os diferentes biomas e entre o hospedeiro e o micobioma são críticas na progressão das doenças (CUI et al., 2013)

O micobioma de diferentes partes do corpo interage entre si. Atualmente a interação melhor compreendida é a que ocorre entre os fungos do trato gastrintestinal e os do trato respiratório: um distúrbio causado por *Candida albicans* no micobioma intestinal pode resultar em doença alérgica pulmonar induzida por *Aspergillus fumigatus* no micobioma pulmonar. Alguns estudos apontam para a importância da utilização de terapia prebiótica e probiótica na regulação do microbioma intestinal, no qual a diversidade

bacteriana intestinal aumentou significativamente enquanto que a diversidade fúngica, principalmente os oportunistas e patogênicos diminuiu. Este efeito resulta na restauração da mucosa intestinal protetiva relacionada à microbiota. A redução ou alteração da microbiota intestinal bacteriana pode resultar em patologias, como por exemplo, a obesidade (CUI et al., 2013).

Além disso, recentemente tem sido sugerido que indivíduos obesos e eutróficos apresentam diferenças na microbiota intestinal (DIBAISE et al., 2008). Um exemplo claro desta influência é o uso de adoçantes artificiais, capazes de induzir a intolerância à glicose, através de alterações na composição e funcionalidade da microbiota bacteriana intestinal, podendo levar ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (SUEZ et al., 2014).

Evidências recentes têm sugerido o envolvimento da microbiota intestinal na regulação energética, assim como no processo inflamatório, sendo, portanto, um fator ambiental relacionado à fisiopatologia da obesidade. Diversos estudos utilizando modelos animais têm sugerido que a composição da microbiota intestinal é diferenciada em indivíduos obesos e eutróficos (BERVOETS et al., 2013).

É aceito que alguns microrganismos fermentam componentes da dieta não digeríveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato (Villela, 2004) (Turnbaugh, 2006) (CANI; DELZENNE, 2009). Estes são facilmente absorvíveis e, estima-se que sejam responsáveis por 10% da energia total da dieta (CANI; DELZENNE, 2009). O acetato é captado pelo fígado, onde serve como substrato para a gliconeogênese, síntese de colesterol e triglicerídeos (MUSSO et al., 2010). A capacidade de fermentar carboidratos à ácidos graxos de cadeia curta varia entre as espécies microbianas, de modo que a composição da microbiota intestinal de um indivíduo influencia na maior ou menor captação de energia (Turnbaugh, 2006).

O propionato e o acetato são ligantes fisiológicos de dois receptores acoplados a proteína G (Gpr): Gpr41 e Gpr43, expressos em diversas células (imunes, endócrinas e adiposas), ativando-os (TURNBAUGH, 2006). A ativação da Gpr43 contribui para a inibição da lipólise e diferenciação dos adipócitos, promovendo uma expansão do tecido adiposo em animais submetidos a uma dieta rica em gorduras (FARIAS et al., 2011). A interação dos AGCC com os receptores Gpr induz, também, à secreção do hormônio peptídeo YY (PYY) envolvido com a redução da motilidade intestinal, permitindo,

dessa forma, maior absorção de nutrientes no lúmen intestinal (Villela, 2004) (Qin et al., 2010).

Além da maior absorção de AGCC, a microbiota intestinal promove, também, uma maior absorção de glicose a partir da fermentação de componentes não digeríveis da alimentação, levando a um aumento da glicemia e, conseqüentemente, insulinemia, dois fatores chaves na regulação da lipogênese. A glicose e a insulina também são importantes no processo de lipogênese de novo no fígado, através da expressão de várias enzimas chaves como Acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS) e de suas proteínas mediadoras ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) e da SREBP-1 (sterol responsive element binding protein). Este aumento foi demonstrado em camundongos “germ free” após a colonização do seu trato gastrointestinal (Loos et al., 2008) (Lee; Mazmanian, 2010).

De acordo com a literatura, a microbiota intestinal está implicada, ainda, com a inibição seletiva do fasting-induced adipose factor (Fiaf), hormônio produzido pela mucosa intestinal, e que atua como inibidor circulante da Lipoproteína lipase (LPL), privilegiando o acúmulo de triglicérides no adipócito e diminuindo a lipólise (Villela, 2004) (Qin et al., 2010) (BRANDT et al., 2006) (TURNBAUGH, 2006) (Loos et al., 2008) (Lee; Mazmanian, 2010).

Assim, embora o papel das bactérias intestinais na modulação da resposta imune sistêmica e da fisiologia intestinal seja amplamente discutido, os efeitos de outros microrganismos comensais são desconhecidos (KIM et al., 2014). Alguns autores relatam um aumento na quantidade de fungos de cerca de 40 vezes após o tratamento de ratos com antibióticos e retorno as quantidades iniciais após o fim do tratamento, exceto *Candida*, a qual permanece mais abundante do que antes do tratamento (DOLLIVE, 2013). O aumento de fungos comensais da microbiota intestinal, em camundongos tratados com antibióticos podem induzir inflamações alérgicas das vias aéreas (KIM et al., 2014).

No trato gastrointestinal humano, a levedura *Candida albicans*, o fungo mais descrito na literatura como membro da microbiota intestinal, pode provocar, por translocação, infecções sistêmicas. Os enterócitos do epitélio intestinal secretam uma grande quantidade e diversidade de muco, o qual tem uma importante função na limitação da multiplicação das células de *C. albicans* neste tecido. Essas leveduras secretam aspartil proteinase, enzima capaz de degradar o muco intestinal, o que contribui para a patogenicidade da levedura, facilitando sua penetração na barreira mucosa e subsequente adesão e invasão nas células epiteliais. Uma variedade de

adesinas fúngicas estão envolvidas na ligação a proteínas de superfície da célula hospedeira, incluindo componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e fibrinogênio (SILVA et al., 2014).

Embora algum conhecimento sobre o papel dos fungos na fisiologia do trato gastrointestinal seja disponível, percebe-se a necessidade de estudos prospectivos do microbioma intestinal para suscitar inferências sobre a interação fungo-hospedeiro na obesidade pela comparação da microbiota intestinal e do perfil imunológico entre indivíduos obesos e eutróficos previamente caracterizados em relação ao perfil nutricional, bioquímico e características clínico-epidemiológicas.

2.3 Métodos de estudo de ecossistemas microbianos intestinais

Através da utilização de métodos moleculares de investigação, pesquisadores sugeriram que o trato gastrointestinal humano contém aproximadamente 1012 microrganismos por mililitro de conteúdo luminal, composto por pelo menos 1800 gêneros e aproximadamente 15000 a 36000 espécies bacterianas diferentes (DIBAISE et al., 2008). Já foram descritos cerca de 50 filos bacterianos compondo a microbiota intestinal, entretanto dois deles são dominantes: Bacteroidetes e Firmicutes (MORALES et al., 2010) (Brandt et al., 2006). Os recém-nascidos são estéreis, no momento do nascimento, não apresentando microbiota intestinal. Nos primeiros dias de vida, começam a adquirir a sua microbiota do trato gastrointestinal, se estabilizando por volta dos dois anos de idade. Após este período, esta comunidade já adquire as mesmas características da idade adulta (BRANDT et al., 2006).

Os trabalhos atuais revelam que a variação na composição e diversidade da microbiota intestinal, caracterizada pelas alterações qualitativas e quantitativas dos filos, gêneros e espécies bacterianas foi correlacionada a obesidade. O primeiro estudo realizado revelando estas alterações foi realizado em ratos obesos e demonstrou um aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes na microbiota intestinal (EVERARD; CANI, 2013).

Diversos estudos são realizados para avaliar a participação das bactérias na microbiota intestinal, entretanto, a diversidade fúngica deste ecossistema é pouco conhecida (GOUBA, et al., 2014). Isso se deve em parte a utilização de técnicas dependentes de cultivo e caracterização morfológica e fisiológica dos fungos, o que restringe a identificação apenas dos cultiváveis (SCUPHAM et al., 2006).

As técnicas de cultivo básicas de fungos remontam a década de 1920 e consistem na inoculação das amostras em meios de cultura sólidos em placas de Petri ou frascos contendo meios de cultura líquidos estéreis. Os resultados dos experimentos são feitos visualmente, através da avaliação do crescimento das estruturas fúngicas e também de modificações do meio de cultura devido a sua composição. Os métodos de cultura de fungos têm evoluído muito nas últimas décadas. Entretanto organismos encontrados em pequenas concentrações ou aqueles que requerem interações com outros organismos não podem ser identificados pelos métodos clássicos de cultivo (CUI et al., 2013).

Assim como as bactérias não cultiváveis, os fungos não cultiváveis compreendem a maior parte do microbioma humano (CUI et al., 2013). Por exemplo, podemos citar o trabalho de Chen et al., 2011, onde somente dois fungos foram obtidos por métodos de cultura: *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* spp., de um total de 37 fungos intestinais relatados, que possuem correlação direta com a hepatite B crônica (CHEN, 2011).

As limitações dos métodos dependentes de cultivo levaram nos últimos vinte anos, a introdução de abordagens independentes de cultivo. Assim, novas metodologias para a classificação dos fungos que não requerem cultivo foram desenvolvidas, tais como análises de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP), impressão digital de fragmentos de DNA codificador para rRNA (OFRG), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e hibridização *in situ* (CUI et al., 2013).

O sequenciamento direto dos genes dos fungos tem-se mostrado o melhor método para caracterização do microbioma. Além disso, com o desenvolvimento das novas plataformas de sequenciamento (454 Roche, Illumina, HiSeq e MiSeq, Ion Torrent) tem apresentado uma melhor relação custo – benefício quando comparada a metodologia clássica de Sanger (CUI et al., 2013).

A seleção de regiões genômicas alvos é uma técnica comum para estudo de diversidade fúngica, assim como ocorre para os estudos de diversidade bacteriana do microbioma. O gene RNA ribossomal é a região alvo mais comumente utilizada, visando principalmente a subunidade menor 18S do rDNA, a subunidade maior 28S do rDNA e a região dos espaçadores internos transcritos (ITS). Entretanto, o RNA 28S vem sendo gradualmente eliminado como região alvo, devido à ausência de diferenciação para muitas espécies fúngicas (CUI et al., 2013).

Até o momento não existe consenso de qual seria a melhor região alvo, 18S ou ITS. Comparada com a

região alvo 18S, a ITS é mais diversificada permitindo melhor classificação filogenética (identificação de gêneros). Entretanto, a alta conservação da região 18S, facilita a amplificação do rDNA fúngico. A escolha de qual região dentro da região alvo ITS deve ser criteriosa, pois iniciadores ITS-1 e ITS-1F devem ser utilizados para amplificação dos basidiomicetos e iniciadores ITS-2 e ITS-4 para amplificação dos ascomicetos (CUI et al., 2013).

Existem poucos relatos da presença de organismos eucariotos na microbiota intestinal que reflitam a abundância ou diversidade de fungos entéricos (SCUPHAM et al., 2006) (GOUBA, et al., 2014). Um dos primeiros estudos para avaliar a micobiota intestinal utilizou como modelo ratos. Os principais filos de fungos descritos foram Ascomycota, Basidiomycota, Chritidiomycota e Zigomycota. Os gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Monilia*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Scleroderma*, *Catenomyces*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*, *Powellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium* e a ordem *Mucorales* (SCUPHAM et al., 2006).

Recentemente um estudo revelou a diversidade de fungos leveduriformes, filamentosos e também organismos protistas na microbiota intestinal. Foram avaliadas fezes de sete indivíduos de quatro países tropicais, dentre eles o Brasil. Foram identificadas 38 espécies de fungos por técnicas de cultivo e técnicas moleculares. Os fungos *Malassezia* sp., *Trichosporon* sp., e *Candida* sp. foram encontrados em todas as amostras analisadas, sugerindo distribuição mundial destes, mas outros estudos são necessários para caracterização completa deste microbioma (GOUBA, et al., 2014).

Em outra abordagem, a avaliação de amostras de fezes de dez indivíduos saudáveis, por de técnicas moleculares, revelou a presença dos seguintes fungos: *Wallemia*, *Trichocomaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Rhodotorula*, *Pleosporaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Ascomycota*, *Amphisphaeriaceae* e *Agaricaceae* (DOLLIVE et al., 2012).

3 DISCUSSÃO

A obesidade, atualmente, configura-se como um sério problema de saúde pública¹, sendo reconhecida como um fator negativo associado a um grande número de doenças como diabetes do tipo 2, doenças vasculares, cardíacas e câncer (Speakman, 2004) (DIXIT, 2008). Suas complicações e implicações metabólicas são consideradas os principais desafios a serem combatidos no século XXI, uma vez que o número de obesos é crescente em todo o mundo,

atingindo inclusive os países mais pobres ou em desenvolvimento (PRENTICE et al., 2006).

O aumento do número de indivíduos obesos e de doenças associadas à obesidade possui um efeito substancialmente negativo na longevidade: redução de 5 a 20 anos na expectativa de vida, dependendo do grau de obesidade (Fontaine; Barofsky, 2001). Dados originados da Pesquisa Nacional sobre Nutrição e Saúde, realizada nos Estados Unidos, mostrou que 33% da população adulta são obesos e 17% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso (Mokdad et al., 2003) (Ogden; Carroll; Flegal, 2008). Este aumento da obesidade entre os mais jovens é um fato preocupante, uma vez que eles apresentarão riscos associados à obesidade durante um longo período de suas vidas (Caballero, 2007).

Além do status imunológico alterado, é sugerido que a composição bacteriana (espécies e abundância) da microbiota intestinal seja única para cada indivíduo. Por outro lado, alguns autores propõem o conceito de um núcleo microbiano comum entre os diferentes hospedeiros, entretanto, esta proposição tem sido questionada visto que, espécies de núcleo anteriormente proposto podem representar menos de 1% do total de componentes da microbiota intestinal em alguns indivíduos semelhantes (MORALES et al., 2010) (Brandt et al., 2006). Apesar da grande variabilidade na composição de espécies (microbiota), os perfis genéticos funcionais (microbiomas) são semelhantes em indivíduos saudáveis. No entanto, essa redundância funcional pode refletir convergência evolutiva de táxons não relacionados, culminando em dificuldades na compreensão do que constitui a variação saudável ou patológica na estrutura da comunidade microbiana (TRAYHURN; WOOD, 2004).

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena (BRANDT et al., 2006). Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC, como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

Assim, as proposições sobre a participação microbiana na etiopatogenia da obesidade reafirma que o sempre foi um desafio para os pesquisadores:

o conhecimento das comunidades microbianas dos diferentes ambientes. A limitação destes estudos no passado foi principalmente devido às metodologias usadas. Inicialmente as investigações eram basicamente observações microscópicas (EIKELBOOM, 1975), porém as diferentes populações bacterianas não podiam ser distinguidas. A partir de métodos baseados em cultivo e isolamento, algumas bactérias começaram a ser identificadas, e essa metodologia foi indispensável para aumentar a compreensão a respeito de organismos específicos (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006).

A grande maioria dos microrganismos não pode ser facilmente cultivada, assim essas técnicas baseada em cultura selecionavam apenas os micro-organismos heterótrofos que melhor se adaptavam as condições de crescimento dos meios gerais de cultivo. Dessa maneira a real composição e diversidade da comunidade microbiana dos diversos ecossistemas eram subestimadas (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006) (WARD; WELLER; BATESON, 1990). Ainda sobre a capacidade de cultivo, em quase todos os sistemas, estima-se que o número de bactérias cultiváveis é extremamente pequeno, menor que 1% (WARD; WELLER; BATESON, 1990).

Alguns grupos de pesquisa têm utilizado técnicas de sequenciamento de nova geração para caracterizar as diferentes populações microbianas, revelando assim que o microbioma humano difere profundamente em diferentes regiões do corpo e entre indivíduos. As diferenças entre as regiões do corpo estão associadas com disponibilidade de nutrientes, água, oxigênio e outros fatores específicos de cada local. A origem das diferenças entre indivíduos, não está totalmente esclarecida, entretanto reflete diferenças na colonização durante a vida e diferentes exposições ambientais, como por exemplo, utilização de antibioticoterapia. Outra exposição ambiental não completamente esclarecida é a dieta (HOFFMANN et al., 2013).

Em relação à participação fúngica na homeostase e, portanto saúde dos hospedeiros, considera-se que o estudo do micobioma humano possa contribuir para expansão do conhecimento sobre a real significância e papel do microbioma humano. Diversos micobiomas em diferentes sítios anatômicos tem sido propostos e diversos padrões de associação fúngica são associados a diferentes patologias (CUI et al., 2013).

O micobioma contribui para a doença através da interação entre este e os diferentes biomas, bem como através da interação direta com o hospedeiro. Estudos futuros de caracterização do micobioma serão importantes para o entendimento da patogênese das doenças, bem como para o desenvolvimento

de novas terapias. Portanto, a caracterização do microbioma intestinal torna-se muito importante para o entendimento do processo da obesidade e para a seleção de novos alvos terapêuticos contra essa nova epidemia mundial, uma vez que pouco se sabe da participação dos fungos da etiopatogenia da doença.

4 CONCLUSÃO

De forma geral, vários estudos têm sugerido a relação entre a obesidade e a microbiota residente intestinal, entretanto esses dados requerem atenção em função da variação regional e social dos indivíduos que pode refletir na qualidade microbiana endógena. Em muitos estudos as diferenças observadas não tem se mostrado homogêneas. Além disso, sugere-se a utilização de diferentes metodologias analíticas e a observação e descrição de um conjunto maior de variáveis que inclua observações intrínsecas no indivíduo, além da simples descrição de peso e IMC, como a inclusão de dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos (regionalismo), e outros fatores

endógenos dos hospedeiros, como características imunológicas.

Neste contexto, a participação dos fungos na microbiota intestinal não está bem esclarecida, ao contrário do observado para as bactérias, apesar das divergências metodológicas. O principal fungo descrito na literatura como integrante da microbiota humana é a levedura *Candida albicans*, e isto se deve em grande parte pela utilização de métodos dependentes de cultura para o estudo dos fungos.

A aplicação de métodos independentes de cultura, baseados em técnicas moleculares de estudo constitui um grande avanço para a avaliação do microbioma intestinal humano. Entretanto, atualmente, poucos estudos estão voltados para o conhecimento da diversidade fúngica existente neste sítio anatômico.

A determinação da composição do microbioma intestinal, bem como sua relação com os demais organismos presentes neste ecossistema, como por exemplo, as bactérias e seu envolvimento na modulação do sistema imune contribuirão significativamente para o entendimento da participação dos fungos na fisiopatologia da obesidade.

The role of microbiota in the modulation hosts homeostasis: correlation between obesity and intestinal mycobiome

ABSTRACT

The fungi play an important role in human health and are components of the human microbiota anatomical sites such as skin, oral cavity, gastrointestinal and genitourinary tract. They are also etiologic agents of various infections, from superficial and systemic mycoses. The fungi are involved in regulating the immune system and may promote the onset of upper airway allergies. They are present in the composition of the intestinal microbiota, forming the mycobiome. Therefore, its role in the development of obesity should be considered, acting both in the modulation of local and through immune response its interaction with other microorganisms in the intestinal microbiota. This paper aims to review the involvement of microorganisms in the obesity etiopathogeny and discuss the involvement of fungi in the intestinal microbiome, its relationship with obesity and future prospects, with the use of molecular methods to better understand the role of fungi in the intestinal microbiota in health and disease.

Keywords: Microbiota, Fungi, Obesity

REFERÊNCIAS

BACKHED F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, no. 44, p. 15718–15723, 2004.

BERNHARD, F. et al. Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology. **Diabetologia**. Berlin, v. 56, p. 311-322, 2013.

BERNOTIENE E.; PALMER G.; GABAY C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. **Arthritis research & therapy**, London, v.8, p. 217, 2006.

BERVOETS, L. et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: across-sectional study. **Gut Pathogens**, London, v.5, no. 10, p. 1-10, 2013.

BOSELLO O.; ZAMBONI M. Visceral obesity and metabolic syndrome. **Obesity reviews** : an official journal of the International Association for the Study of Obesity, Oxford, v. 1 p. 47-56, 2000.

- BRANDT, K. G. et al. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**. São Paulo, v. 28, n. 2, p.117-127, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2013. **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 brasileiros e no distrito federal em 2013 (Série G. Estatística e Informação em Saúde). Brasília, p.1-120, 2014.
- CABALLERO B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiologic reviews**, Baltimore, v. 29, p. 1-5. 2007.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 15, p. 1546-1558, 2009.
- CHEN, Y. et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York v. 70, n. 4, p. 492-498, ago. 2011.
- CUI, J. A. et al. The human mycobiome in health and disease. **Genome Medicine**, London, v.5, no.63, p.1-12, 2013.
- DARDENNE M. et al. Growth hormone modulates migration of developing T cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1153, p. 1-5, 2009.
- DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. **Annual review of nutrition**, Palo Alto, v. 31, p. 15-31, 2011
- DIBAISE, J.K. et al. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, Oxford, v.83, no.4, p.460-469, 2008.
- DIXIT, V. D. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of Leukocyte Biology**. New York, v.84, p.882-892, out. 2008.
- DOLLIVE, S. et al. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. **Genome Biology**, London, v.13, p.1-13, 2012.
- DOLLIVE, S. et al. Fungi of the Murine Gut: Episodic Variation and Proliferation during Antibiotic Treatment. **PLoS One**, San Francisco, v.8, no. 8, p. 1-12, ago. 2013.
- DUNCAN, S.H. et al. Human colonic microbiota associated with diet obesity and weight loss. **International journal of obesity**, London, v. 32, p. 1720-1724, 2008.
- EIKELBOOM, D.H. Filamentous organisms observed in activated sludge. **Water Research**, Oxford, v. 9, p. 365-388, 1975.
- EVERARD, A.; CANI, P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v.27, p. 73-83, 2013.
- FARIAS, M. N. et al. Microbiota intestinal: rol in obesidad. Revista chilena de nutrición : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Nutrición, **Bromatología y Toxicología**, Santiago. v. 38, n. 2, 2011.
- FLINT, H. J. Obesity and the gut microbiota. **Journal of clinical gastroenterology**, New York, v. 45, no. 3, p. 128-132, 2011.
- FONTAINE K.R.; BAROFSKY I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity reviews** : an official journal of the International Association for the Study of Obesity, Oxford, v. 2, p. 173-182, 2001.
- GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L.A.. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 1-20, 2006.
- GOUBA, N. et al. Eukaryote Culturomics of the Gut Reveals New Species. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, no. 9, p.1-5, set. 2014.
- HADDAD J.J.; SAADE N.E., SAFIEH-GARABEDIAN B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v.133, p.1-19, 2002.
- HAN, J. M.; LEVINGS, M. K. Adipose Inflammation Immune Regulation in Obesity-Associated. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.191, p. 527-533, jul. 2013.
- HOFFMANN, C. et al. Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. **PLoS One**, San Francisco, v.8, no. 6, p. 1-12, jun. 2013.
- KIM, Y. et al. Gut Dysbiosis Promotes M2 Macrophage Polarization and Allergic Airway Inflammation via Fungi-Induced PGE2. **Cell Host and Microbes**, Cambridge, v.15, no. 1, p. 95-102, jan. 2014.
- LA CAVA A.; MATARESE G. The weight of leptin in immunity. Nature reviews. **Immunology**, London, v. 4, p. 371-379, 2004.
- LAM Q.L.; LU L. Role of leptin in immunity. **Cellular & molecular immunology**, Beijing, v.4, p.1-13, 2007.
- LEE Y.K.; MAZMANIAN S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, London, v. 330, no. 6012 p. 1768-1773, 2010.
- LOOS R. J. et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. **Nature genetics**, New York, v. 40, no. 6, p. 768-775, 2008.

- MAZMANIAN, S. K. et al. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, Cambridge, v. 122, no. 1, p.107-118, jul. 2005.
- MOKDAD A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **Jama**, Chicago, v.289, p. 76-79, 2003.
- MOLLER D. E.; KAUFMAN K. D. Metabolic Syndrome: A Clinical and Molecular Perspective. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, no. 56 p. 45, 2005.
- MORALES, P. et al. La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidade. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v.138, n. 8 p.1020-1027, 2010.
- MUSSO, G. et al. Obesity, diabetes and gut microbiota : The hygiene hypotheses expanded?. **Diabetes care**, New York, v. 33, no. 10, p. 2277-2284, 2010.
- OGDEN C.L.; CARROLL M.D.; FLEGAL K.M. High body mass index for age among US children and adolescents, 2003-2006. **Jama**, Chicago, v. 299, p. 2401-2405, 2008.
- PRENTICE, A. M. et al. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 35, p.93-99, 2006.
- QIN J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n0.7285, p. 59-65, 2010.
- SAHU A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in neuroendocrinology**, New York, v. 24, p. 225-253, 2003.
- SCUPHAM, A. j. et al. Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, no. 1, p. 793-801, jan. 2006.
- SIEGMUND, B. et al. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. **European Journal of Immunology**. Weinheim, v. 32, no. 2, p.552-560, fev. 2002.
- SILVA, R. C. et al. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 2-9, 2014.
- SPEAKMAN J. R. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. **The Journal of nutrition**, Springfield, v. 134, p. 2090S-2105S, 2004.
- SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, London, v.0, no. 0, p.1-17, 2014.
- TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. **Nutrition**, metabolism and cardiovascular diseases, Amsterdam, v. 23, p. 160-168, 2013.
- TILG H.; KASER A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 121, no .6, p.2126-2132, 2011.
- TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutritional Neuroscience**, Boca Raton, v.0, no.0, p.1-18, 2013.
- TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British journal of nutrition**, Cambridge, v. 92, p. 347-355, 2004.
- TURNBAUGH P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, London, v. 444, no. 7122, p. 1027-1031, dez. 2006.
- TURNBULL A.V.; RIVIER C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 79, p. 1-71, 1999.
- VAEL, C. et al. Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut Pathogens**, London, v.3, no. 8, p. 1-7, 2011.
- VELLOSO L.A.; SAVINO W; MANSOUR E. Leptin action in the thymus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1153 p. 29-34, 2009
- VILLELA N.B. et al. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición hospitalaria**, Madrid, v.19, no. 6, p. 367-371, 2004.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v. 345, p. 63-65, 1990.
- WILLIAMS G. et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & behavior**, Oxford, v. 74, p. 683-701, 2001.
- WILLIAMS G.; HARROLD J. A.; CUTLER D. J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 59, p. 385-396, 2000.
- ZHAO et al. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.300, p.247-252, 2003.

Enviado em //

Aprovado em //



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

Francis M. Borges¹ · Thaís O. de Paula¹ · Marjorie R. A. Sarmiento¹ · Maycon G. de Oliveira¹ · Maria L. M. Pereira¹ · Isabela V. Toledo¹ · Thiago C. Nascimento¹ · Alessandra B. Ferreira-Machado¹ · Vânia L. Silva¹ · Cláudio G. Diniz¹

Received: 10 February 2017 / Accepted: 16 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 *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Fonsecaea* sp., and *Geotrichum* sp. (76.39, 65.28, 59.72, 58.33, 12.50, and 9.72%, respectively). As for Basidiomycota, *Trichosporon* sp. and *Rhodotorula* 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 mycobiota shift towards obesity, with slightly higher diversity associated to eutrophic individuals. This mycobiota 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 mycobiota 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, 13].

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 mycoteca to be available for further investigations on microbial ecology [29].

✉ Cláudio G. Diniz
claudio.diniz@ufjf.edu.br

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

Materials and Methods

Participants and Specimen Collection

This is a cross-sectional and case-controlled study approved by the Human Research Ethics Committee (479.002/2013) at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF). There were 72 adult participants selected from a clinic nutrition service at the UFJF teaching hospital and from the community (city of Juiz de Fora, MG, Brazil). Participant selection criteria for study participants included the following: age between 18 and 60 years and no record of intestinal diseases, diabetes, or use of antimicrobial drugs during the last month. Anthropometric measurements were taken after written informed consent was obtained. The participants were classified as eutrophic, overweight, or obese in accordance with their body mass index (BMI). Fecal samples were collected in sterile vials given to the participants after informed consent and physical data measurement. All the participants were instructed to collect the feces samples in the next morning after personal hygiene and send immediately to the research laboratory for analysis.

Dietary Assessment

A quantitative food frequency questionnaire (QFFQ) was used to estimate the habitual dietary intake of the participants and further evaluation of ingested macronutrients (carbohydrates, proteins, fibers, and lipids). For each QFFQ item, the volunteers reported the average frequency of habitual consumption (daily, weekly or monthly) for the last 6 months and the size of the portion ingested. The analysis of habitual food consumption was performed using tables of food composition [4].

Fungi Isolation and Quantification

The fecal samples were homogenized and 1 g aliquots were submitted to a tenfold serial dilution in sterile saline solution (NaCl, 0.9%). Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (SDC) was inoculated with 0.1 ml from the 10^{-1} to 10^{-3} dilutions. Fungal samples were incubated at 28 °C for up to 7 days in aerobic conditions. Specimen isolation and colony forming unit (CFU) counts were performed after 5–7 days, and the CFU/g of feces was calculated for both filamentous fungi and yeast samples. In a qualitative approach, only random, isolated colonies representative of the macro morphological diversity were picked for further characterization upon visual inspection.

Fungi Characterization

The fungal samples were characterized as yeast-like or filamentous according to their macroscopic characteristics. For the filamentous samples, microscopic identification was performed using microculture using potato dextrose agar [14, 17, 21]. The yeast samples were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and carbon assimilation tests (auxanogram) [2, 16] followed by formic acid/ethanol protein extraction in accordance with the Bruker Daltonics GmbH protocol [1, 19]. Positive controls were also inoculated with 1 µL of microbial test standard solution (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), 0.001 of *Candida albicans* INCQS 40175, and *Candida krusei* INCQS 40147. The identification of yeast samples was performed using MALDI-TOF MS Biotyper RTC software 3.0 (Bruker Daltonics). The results were scored as log score values according to the manufacturer's requirements and were classified into 1 of the following 3 groups: secure genus and species identification (>2.0), secure genus identification (1.7–2.0), or no reliable identification (<1.7). The mass spectra were visualized by Bruker Daltonics flexAnalysis version 3.3.75.0 software and investigated by ClinProTools version 3.0 software (Bruker Daltonics) [5, 14].

Molecular Identification of Representative Fungi Isolates

The genomic DNA from representative samples of the most prevalent identified fungi groups was extracted using Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals, France). The DNA extracts were used as template for polymerase chain reactions (PCR) targeting the molecular marker 18S rDNA using the universal primers FungiQuant-F: 5'-GGRAAACTCACCAGG TCCAG-3' and FungiQuant-R: 5'-GSWCTATCCCCAK CACGA3' [8, 18]. The PCR cycles were composed of an initial denaturing step of 95 °C for 5 min, followed by 50 amplification cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s and a final extension was 72 °C for 5 min [18]. Amplicons were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.) and the DNA fragments obtained were sequenced in an ABI Prism 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA), and results blasted against the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Statistical Analysis

Data on fungi quantification were considered not normally distributed and were therefore analyzed using nonparametric tests. For statistical calculations, the Kolmogorov–Smirnov

normality test was performed using 5% significance and the Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used for groups comparison and a P -value of <0.05 was considered statistically significant. The data were normalized to Log_{10} to express these results. Spearman's correlation coefficient was used to analyze the association between the count of fungi (fungi total, filamentous, and yeast) and macronutrients. Canonical Correlation Analysis (CCA) was performed between the principal components of data estimated in the multivariate analysis (axis 1 and axis 2). Statistical calculations were performed using IBM SPSS for Windows version 20.0 software (IBM, Armonk, NY, USA), PAST (version 3.14) program, and XLSTAT program (version 2014.1.04) in Microsoft Excel 2016 (Addinsoft).

Results

The sociodemographic characteristics of the 72 volunteers are shown in Table 1. The eutrophic and obese groups consisted mainly of women. Overall, the average age was 39.61. Measurements for abdominal, waist, and hip circumferences; waist–hip ratios; and BMI gradually increased from eutrophic towards the obese group. In females, anthropometric measurements displayed significance differences between the eutrophic and obese groups.

The total fungi CFU count in this study was 21.237. Filamentous fungi or yeasts were observed in fecal samples of all volunteers with a mean count of 295 CFU/g of feces. To

perform statistical analyses, the CFU counts were normalized as Log_{10} , as the resulting data were nonparametric and abnormally distributed. The mean count of yeast was 1.86, 2.20, and 2.23 log_{10} CFU/g of feces and the mean count of filamentous fungi was 1.94, 2.58, and 1.07 log_{10} CFU/g in eutrophic, overweight, and obese, respectively (Table 2). The cultivable gut mycobiota did not indicate a significant difference within the three groups, except for the filamentous fungi in the eutrophic and obese groups ($P < 0.05$). We isolated 1136 fungal colonies representative of the macro morphological diversity, identified 854, and classified 34 different genera or species. Of the isolated samples, 25% were unable to be identified (filamentous fungi [268 samples]; yeasts [14 samples]). Overall, all yeast samples except *Trichosporon* were identified at the species level, whereas all filamentous fungi samples were identified only up to genus level. Only one species was observed for each yeast genus except for *Candida* sp., in which we identified 10 different species, as described below. Identification of the fungi was confirmed by the sequencing of the taxonomic marker 18S rDNA of isolates representative of the most prevalent genera of fungi observed.

Several filamentous fungi and yeasts and a common cluster of 16 different fungi were identified in both genders. Besides the common cluster, in the female group several additional fungi were exclusively observed, if compared to the male group (Fig. 1).

Genera or species distribution was relatively even among the 3 different volunteer groups. A common fungi cluster

Table 1 Sociodemographic and anthropometric characteristics of the volunteers included in the study

Characteristics	Groups of individuals			$P < 0.05^*$
	Eutrophic ($n = 24$)	Overweight ($n = 24$)	Obese ($n = 24$)	
Gender (male/female)	5/19	12/12	9/15	
Average age (years \pm SD)	37.91 \pm 12	38.12 \pm 13.38	42.79 \pm 11.67	
Average body mass index (mean \pm SD)	22.82 \pm 1.77	27.01 \pm 1.34	36.98 \pm 6.04	a, b, c
Abdominal circumference (mean \pm SD)				
Male	93.80 \pm 9.80	94.75 \pm 4.12	111.22 \pm 16.63	b, c
Female	82.29 \pm 5.00	94.63 \pm 5.87	118.73 \pm 14.10	a, b, c
Waist circumference (mean \pm SD)				
Male	87.00 \pm 9.19	91.00 \pm 4.12	110.66 \pm 17.38	b, c
Female	74.92 \pm 4.34	86.42 \pm 4.93	113.33 \pm 15.79	a, b, c
Hip circumference (mean \pm SD)				
Male	100.00 \pm 4.12	104.91 \pm 3.87	110.77 \pm 4.32	b, c
Female	99.21 \pm 4.83	105.91 \pm 4.67	124.13 \pm 13.04	a, b, c
Waist–hip ratio (mean \pm SD)				
Male	0.87 \pm 0.70	0.87 \pm 0.55	1.00 \pm 0.16	b, c
Female	0.75 \pm 0.40	0.81 \pm 0.50	0.93 \pm 0.08	a, b, c

*Significant statistical analysis: a: comparison between eutrophic and overweight volunteers' values; b: comparison between obese and overweight volunteers' values; c: comparison between eutrophic and obese volunteers' values

Table 2 Total fungi, filamentous, and yeasts counts isolated from eutrophic, overweight, and obese individuals

Mean \pm SD fungi count (Log ₁₀ CFU/g of feces*)	Groups of individuals			<i>P</i> < 0.05**
	Eutrophic (<i>n</i> = 24)	Overweight (<i>n</i> = 24)	Obese (<i>n</i> = 24)	
Total fungi	2.20 \pm 0.74 ^b	2.74 \pm 1.07 ^b	2.26 \pm 0.58 ^b	
Filamentous	1.94 \pm 0.80 ^{a,b}	2.58 \pm 1.19 ^b	1.07 \pm 0.44 ^{a,b}	a
Yeast	1.86 \pm 0.88 ^b	2.20 \pm 1.05 ^b	2.23 \pm 0.81 ^b	

SD standard deviation

*Log₁₀ of colony forming units (CFU) per gram of fecal specimens were calculated to normalize and present the data.

**Significant statistical analysis: a: comparison between eutrophic and obese volunteers' values (Wilcoxon Matched-Pairs Signed Ranked Test), b: no statistically significant difference

Total genera/species count

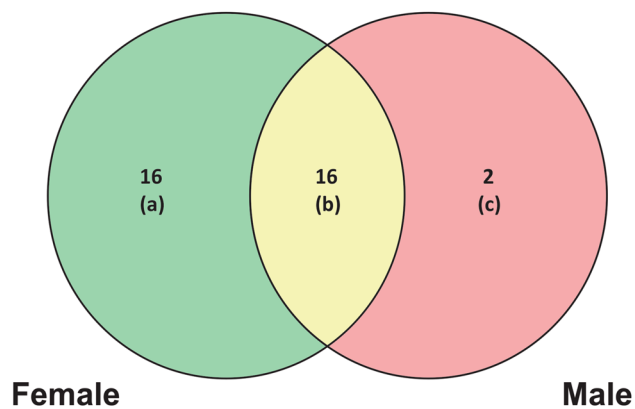


Fig. 1 Venn diagram representative of the fungal diversity and qualitative clustering according to their occurrence exclusively or shared between males and females. **a** *Acremonium* sp., *Beauveria* sp., *Bipolaris* sp., *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *E. dermatitidis*, *Emmonsia* sp., *Fonsecaea* sp., *G. silvicola*, *Helminthosporium* sp., *Phialophora* sp., *Pichia manshurica*, *Syncephalastrum* sp.; **b** *Aspergillus* sp., *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Drechslera* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *R. mucilaginosa*, *Rhizopus* sp., *S. cerevisiae*, *Scopulariopsis* sp., *Trichosporon* sp.; **c** *C. lipolytica*, *L. elongisporus*

comprising 13 genera or species was observed and included 8 different filamentous fungi and 5 different yeasts (Fig. 2).

The predominant phylum was Ascomycota, which contained 20 different fungi, followed by phyla Zygomycota and Basidiomycota with 3 and 2 different fungi, respectively. Zygomycota and Basidiomycota were found in eutrophic, overweight, and obese groups, with exception of *Syncephalastrum* sp. (Zygomycota), which was found only in eutrophic individuals. As for Ascomycota, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Fonsecaea* sp., and *Geotrichum silvicola* were the most isolated fungi (76.39, 65.28, 59.72, 58.33, 12.50, and 9.72%, respectively). Within the genus *Candida*, 10 species were identified: *C. parapsilosis* (29.17%); *C. albicans* (16.67%); *C.*

guilliermondii and *C. krusei* (2.78%); and *C. glabrata*, *C. pararugosa*, *C. metapsilosis*, *C. intermedia*, *C. lipolytica*, and *C. orthopsilosis* (1.39%). As for Basidiomycota, *Trichosporon* sp. was the most frequently identified genus (30.56%). *Rhodotorula mucilaginosa* was also identified (15.28%). In the Zygomycota phylum, *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. were the most prevalent for filamentous fungi (15.28 and 9.72%, respectively). Other fungi were observed in rates <9.0% (Table 3).

When evaluating the relative abundance on fungi isolation in the different individual groups, the major fungi groups were observed at similar rates among all the isolates. In qualitative terms, the results suggest a slightly higher diversity of fungi within eutrophic individuals if compared to the overweight and obese groups (Fig. 3).

Considering the association between the count of fungi (fungi total, filamentous, and yeast) and macronutrients, as observed by the Spearman correlation test, a positive correlation was observed between the macronutrient carbohydrate and the filamentous fungi count in the overweight group ($r=0.534$) (Fig. 4). Although other positive correlations were observed, no strong correlations ($P < 0.05$) were observed between the three groups of individuals (eutrophic, overweight, and obese) for macronutrients (carbohydrates, proteins, lipids, and fibers) and fungi counts (total, filamentous, and yeast fungi).

In order to classify group of individuals (eutrophic, overweight, and obese) according to their macronutrients intake and fungi isolation, a canonical correlation analysis was performed. The two first discriminant functions (axis 1 and 2) expressed 84.1% of the total variation, with 48.5% for the first discriminant function and 35.6% for the second (Fig. 4). The eigenvalues, which indicate the ratio of between-groups variability to within-groups variability for a function, were 0.082 and 0.060 for the first and second functions, respectively. The eutrophic group was the most differentiated. The protein macronutrient and *C. parapsilosis* fungi play an important role in group discrimination on axis 2, and eutrophic group was the most unique of the

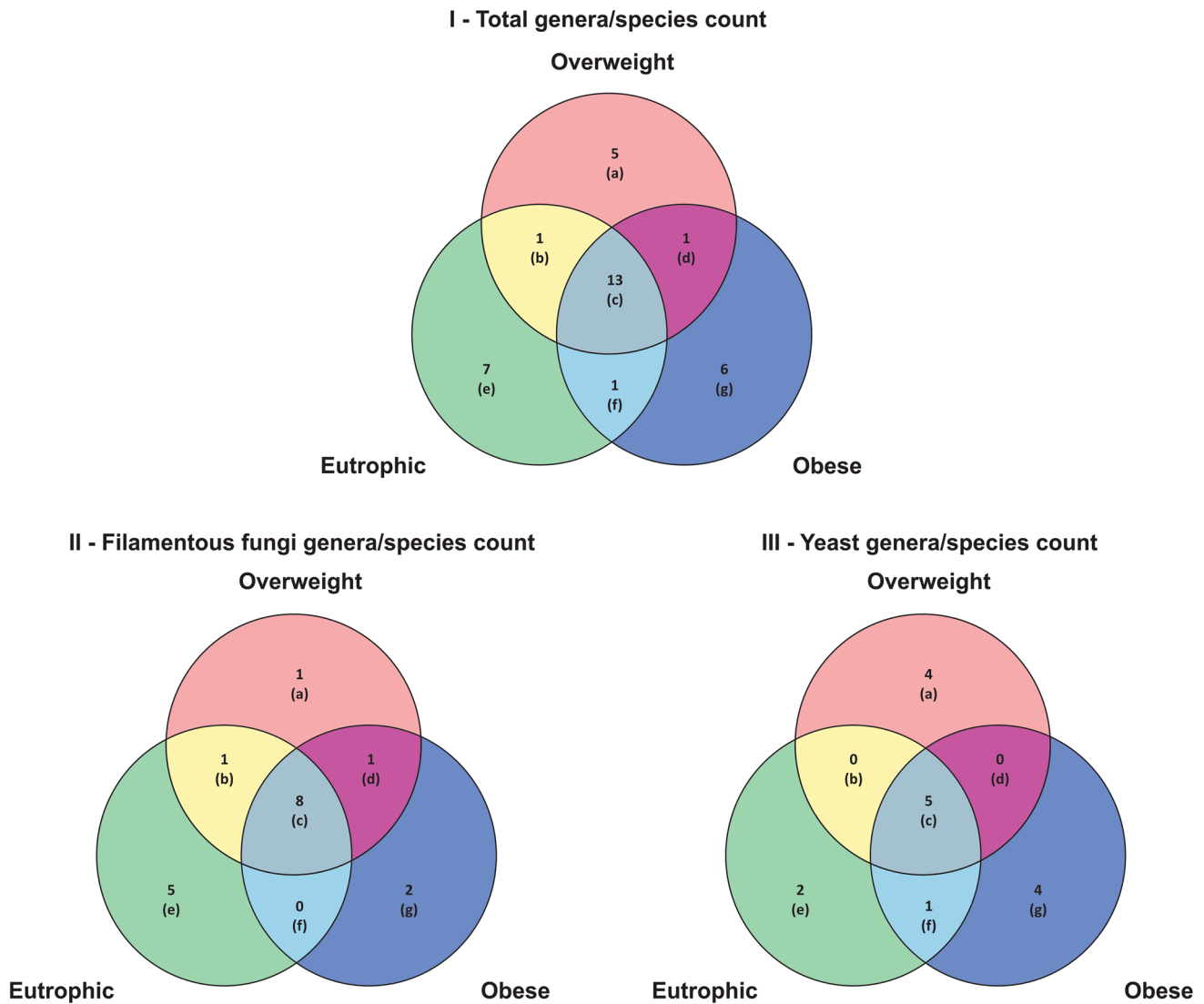


Fig. 2 Venn diagram representative of the fungal diversity and qualitative clustering according to their occurrence exclusively or shared between eutrophic, overweight, and obese individuals. **a** Filamentous fungi (*Drechslera* sp.), yeasts (*C. intermedia*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *L. elongisporus*); **b** filamentous fungi (*Acremonium* sp.); **c** filamentous fungi (*Aspergillus* sp., *Fonsecaea* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phialophora* sp., *Rhizopus* sp., *Scopu-*

lariopsis sp.), yeasts (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*, *S. cerevisiae*, *Trichosporon* sp.); **d** filamentous fungi (*Cladosporium* sp.); **e** filamentous fungi (*Beauveria* sp., *Bipolaris* sp., *E. dermatitidis*, *Helminthosporium* sp., *Syncephalastrum* sp.), yeasts (*C. pararugosa*, *Pichia manshurica*); **f** yeast (*G. silvicola*); **g** filamentous fungi (*Chaetomium* sp., *Emmonsia* sp.), yeasts (*C. glabrata*, *C. metapsilosis*, *C. krusei*, *C. orthopsilosis*)

three groups with respect to these discriminator variables. Discriminator variables carbohydrate macronutrient and the *Scopulariopsis* sp (axis 2), *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., and *Fonsecaea* sp. fungi (axis 1) separated obese group from the other groups. There was no grouping of the individuals of the overweight group related to the discriminant functions analyzed in the two axis; therefore, these individuals are characterized as not homogeneous and may behave like a transitional group (Fig. 4).

Discussion

Little is known about specific host conditions (such as obesity) that may influence the composition of the fungal community. As long as it is accepted that the bacterial microbiota is affected by various factors, it is reasonable to presume that several adverse conditions may influence fungi components. In the obese physiology, changes are expected in the intestinal microbiota [11, 28, 34, 35].

Table 3 Qualitative distribution and relative abundance of filamentous fungi and yeasts isolated from eutrophic, overweight, and obese individuals (A); Distribution of *Candida* species (B)

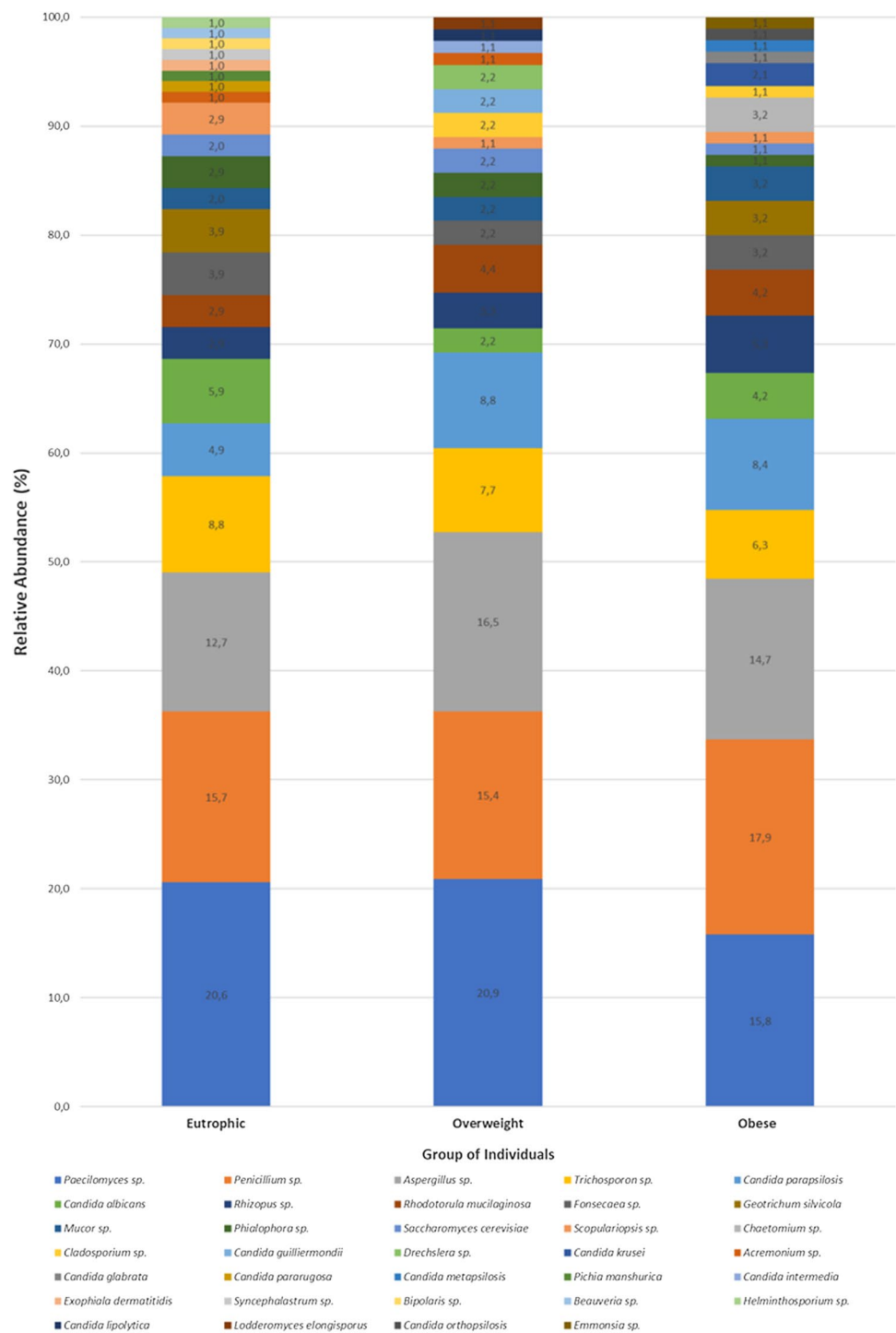
Fungi	Groups of individuals			Total	Relative abundance (%)
	Eutrophic (n=24)	Overweight (n=24)	Obese (n=24)		
(A) <i>Paecilomyces</i> sp.	21	19	15	55	76.39
<i>Penicillium</i> sp.	16	14	17	47	65.28
<i>Candida</i> sp.	12	14	17	43	59.72
<i>Aspergillus</i> sp.	13	15	14	42	58.33
<i>Trichosporon</i> sp.	9	7	6	22	30.56
<i>Rhizopus</i> sp.	3	3	5	11	15.28
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	4	4	11	15.28
<i>Fonsecaea</i> sp.	4	2	3	9	12.50
<i>Geotrichum silvicola</i>	4	0	3	7	9.72
<i>Mucor</i> sp.	2	2	3	7	9.72
<i>Phialophora</i> sp.	3	2	1	6	8.33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	2	1	5	6.94
<i>Scopulariopsis</i> sp.	3	1	1	5	6.94
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	3	3	4.17
<i>Cladosporium</i> sp.	0	2	1	3	4.17
<i>Drechslera</i> sp.	0	2	0	2	2.78
<i>Acremonium</i> sp.	1	1	0	2	2.78
<i>Pichia manshurica</i>	1	0	0	1	1.39
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	0	0	1	1.39
<i>Syncephalastrum</i> sp.	1	0	0	1	1.39
<i>Bipolaris</i> sp.	1	0	0	1	1.39
<i>Beauveria</i> sp.	1	0	0	1	1.39
<i>Helminthosporium</i> sp.	1	0	0	1	1.39
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	0	1	0	1	1.39
<i>Emmonsia</i> sp.	0	0	1	1	1.39
(B) <i>Candida parapsilosis</i>	5	8	8	21	29.17
<i>Candida albicans</i>	6	2	4	12	16.67
<i>Candida guilliermondii</i>	0	2	0	2	2.78
<i>Candida krusei</i>	0	0	2	2	2.78
<i>Candida glabrata</i>	0	0	1	1	1.39
<i>Candida pararugosa</i>	1	0	0	1	1.39
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1	1	1.39
<i>Candida intermedia</i>	0	1	0	1	1.39
<i>Candida lipolytica</i>	0	1	0	1	1.39
<i>Candida orthopsilosis</i>	0	0	1	1	1.39

In this study, increased varieties of filamentous fungi were isolated from eutrophic individuals when compared to obese individuals. Considering the limitations of the methodological approach, (e.g., diversity evaluation based on culture-dependent methodology using a single culture condition and limited by filamentous fungi overgrowth) colony selection was difficult in order to ensure high-quality control in further experiments. Adding to that, as this study was a cross-sectional and case-controlled study involving clinical specimens of humans classified in three different groups (eutrophic, overweight, and obese), it was not possible to obtain the same number of male and female participants in

the three groups, even because participants were selected from a clinical nutrition service. Increased diversity of filamentous fungi was noticed, which is contrary to many studies, where approximately 40% of the fungal taxa reported from the gut are yeasts. However, by the Spearman Correlation Test, we may suggest that the count of filamentous fungi is positively correlated to an increased intake of carbohydrate by the individuals in the overweight group.

These findings are consistent with the literature, where a marked tendency towards decreased diversity was observed in obese individuals in a cohort study [27]. Yeasts represented 63.4% of the taxa reported from multiple studies,

Fig. 3 Relative abundance of fungi and distribution among eutrophic, overweight, and obese individuals groups

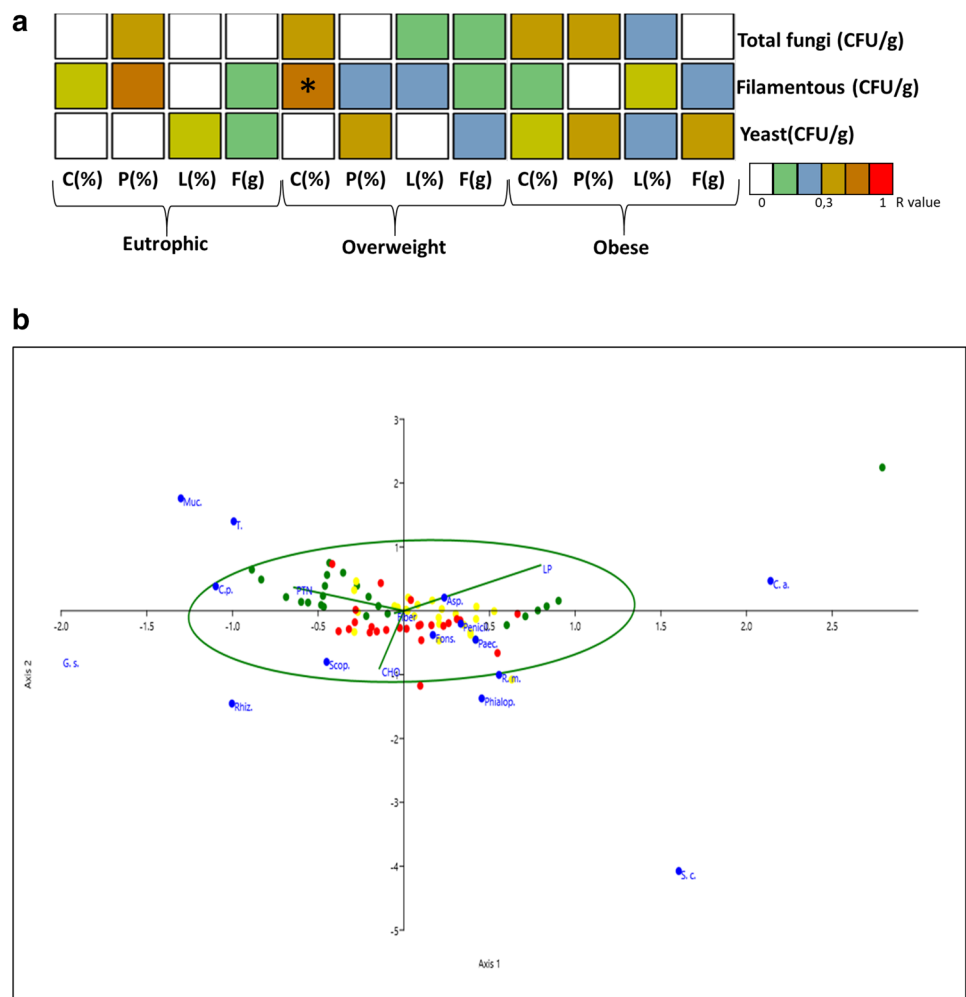


where 10/12 most detected fungi were yeasts [33]. *Candida* is one of the most common yeasts of the gastrointestinal tract, but bacterial dysbiosis may influence a shift in *Candida* commensalism to pathogenesis, leading to extended infections and candidiasis.

Considering the number of participants, several fungi taxa were described. Different studies have characterized the mycobiome of the gastrointestinal tract in healthy

individuals by culture independent approaches. Six fungi genera were reported by pyrosequencing the fecal metagenome from healthy volunteers, and when using deep-sequencing to evaluate the effect of diet on the fungal and bacterial components of the gut microbiota, the presence of 12 and 15 genera was reported, respectively [12, 31]. To date, there are few published studies focused on gut fungi microbiota [22].

Fig. 4 Relationships between cultivable human mycobiota and macronutrients. **a** Heat map (Spearman test) showing associations of count of total fungi, filamentous fungi and yeast (CFU/g) with macronutrients data. The heat map is organized with fungi in rows and macronutrients parameters in columns. * $P < 0.05$. C: carbohydrates, P: protein, L: lipids, F: fiber. **b** Canonical Correspondence Analysis Canonical discriminant plot for scores of fungi and macronutrients based on the first two canonical discriminant axis separating eutrophic, overweight and obese individuals. CHO: Carbohydrates; LP: Lipids; C.p.: *Candida parapsilosis*; C.a.: *Candida albicans*; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; G.s.: *Geotrichum silvicola*; R.m.: *Rhodotorula mucilaginosa*; T.: *Trichosporon* sp.; Paec.: *Paecilomyces* sp.; Penicil.: *Penicillium* sp.; Asp.: *Aspergillus* sp.; Muc.: *Mucor* sp.; Rhiz.: *Rhizopus* sp.; Fons.: *Fonsecaea* sp.; Phialop.: *Phialophora* sp.; Scop.: *Scopulariopsis* sp.; Green dots: eutrophic individuals; yellow dots: overweight individuals; red dots: obese individuals



Ascomycota, with 17 different genera, was the predominant phylum, followed by Basidiomycota (*Trichosporon* sp. and *R. mucilaginosa*), and Zygomycota (*Mucor* sp., *Rhizopus* sp., and *Syncephalastrum* sp.). The intestinal fungi tended to be distributed along the Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota, and Microsporidia phyla, although the latter has been associated with human intestinal diseases. In Zygomycota, members of the order Mucorales, such as *Rhizopus*, *Mucor*, and *Absidia*, have reportedly already been found in the human gastrointestinal tract. More than 48 genera of different basidiomycetes have been detected in the human digestive tract, whereas more than 84 genera in the phylum Ascomycota have been reported [11]. Using metagenomics, another study suggested that the gut mycobiome of obese individuals may be related to an increase in Ascomycota when compared to gut mycobiome of non-obese individuals [27]. The relatively high amount of unidentified fungi in the current study (25%) may be related to the methodological limitations, such as the absence of filamentous fungi sporulation during microculture, or the absence of a reference in the MALDI-TOF database for yeast identification.

Considering the little known ecology underlying the fungi and bacteria in the gut ecosystem, a negative correlation has been reported between *Candida* spp. and *Bacteroides* sp. This negative correlation is related to the observation of an increased *Candida* population and a decreased *Bacteroidetes* population in obese individuals [12, 22]. Once it is well accepted that the microbiota shift during obesity, these observations are particularly relevant, especially regarding the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, where an increase of *Firmicutes* and decrease of *Bacteroidetes* are observed in obese individuals [9, 27]. In our study, obese individuals seem to be displaying higher yeast counts, and it is reasonable to suggest that these increased fungi counts would be correlated to a decrease in *Bacteroidetes* population.

The increased fungal isolation and diversity among female individuals when compared to males may be related to the interference of sexual hormones because sexual hormones may modulate microbiota composition, especially fungi [32].

Paecilomyces sp. was predominant in eutrophic and overweight individuals. *Penicillium* sp. was the most isolated

fungi in the obese group in accordance with other studies [27]. In general, human-associated fungi are opportunistic pathogens and ubiquitous. In this regard, most fungal diseases are related compromised host defenses. For example, it is notable that *Aspergillus* spp. are one of the most frequent disease-associated filamentous fungi in the human gut, even though it is ubiquitous [20]. Other fungi such as *Alternaria*, *Scedosporium*, *Paecilomyces*, and *Trichoderma* are also commonly found [30].

Candida spp. have been associated with the gut microbiota of healthy humans, although some studies suggest a linkage between increased *Candida* spp. populations and diabetes and inflammatory disorders in the gut. Our data do not point out differences in cultivable *C. albicans* in obesity. However, by the Canonical Correlation Analysis of the data, we may suggest that occurrence of *C. parapsilosis* associated to an increased intake of protein by the hosts, these parameters have influenced the grouping of the eutrophic individuals [27].

Trichosporon sp. was the most prevalent yeast in eutrophic individuals. These yeasts are ubiquitous in the environment and may colonize the human gastrointestinal system. These yeasts have been reported with invasive infections in immunocompromised patients related to nosocomial infections [7]. Increased numbers of *Rhodotorula* were isolated from fecal specimens from overweight and obese individuals. Despite their ubiquitous ecology, these yeasts are becoming related to patients with metabolic abnormalities [27].

It is well accepted that disruption of the gut ecosystem contributes to several diseases. For example, antibiotic treatment alters the composition of the community, which may make the individual vulnerable to invasion by a pathogenic microorganism. In patients suffering from inflammatory bowel disease, dysbiosis is frequently observed [15]. Although little is known about fungi ecology during obesity, we suggest that a microbiota shift may interfere with fungi diversity for other metabolic conditions.

A collection of over 800 fungi samples are available for microbial biology and ecological studies to better address several issues regarding the human mycobiota. While the function of the colonic bacterial microbiota has been broadly characterized, little is known about the mycobiome in human large intestine and feces [6]. A limitation in mycological culture methods has been recently addressed with advances in mass spectrometry techniques, which can accurately and rapidly identify microorganisms (MALDI-TOF) [21].

Overall, the data produced in this study may suggest that indeed there is a gut mycobiota shift towards obesity, being overweight individuals a transitional group. This mycobiota shift is also related to the nutritional behavior of the individuals, as observed that the macronutrients intake may be positively related to the different fungi occurrences. Even

considering the panoramic view of the fungal diversity in the human gut when comparing different individual groups, further prospective studies are thus needed to better address the role of fungi microbiota in obese and overweight individuals, especially considering limitations, such as distribution of gender in the study group and different methodological approaches.

Acknowledgements The authors are grateful to the Postgraduate Program in Health (PPgS/UFJF) and *Pro-Reitoria de Pesquisa* (PROPEQS/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).

References

1. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M (2011) Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 17:1359–1365
2. Barnett JA, Ingram M (1955) Technique in the study of yeast assimilation reactions. *J Appl Microbiol* 18:131–148
3. Cani PD, Delzenne NM (2007) Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:729–734
4. Collins CE, Boggess MM, Watson JF, Guest M, Kerith Duncanson K, Pezdirc K, Rollo M, Hutchesson MJ, Burrows TL (2013) Reproducibility and comparative validity of a food frequency questionnaire for Australian adults. *Clin Nutr* 1–9
5. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Ver* 36:380–407
6. Cui L, Morris A, Ghedin E (2013) The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* 5:63
7. de Almeida AA, do Amaral Crispim B, Grisolia AB, Svidzinski TIE, Ortolani LG, de Oliveira KMP (2016) Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. *Rev Argent Microbiol* 48:62–66
8. Dollive S, Peterfreund GL, Sherrill-Mix S, Bittinger K, Sinha R, Hoffmann C, Nabel CS, Hill DA, Artis D, Bachman MA, Custers-Allen R, Grunberg S, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD (2012) A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biol* 13:R60
9. Everard A, Cani PD (2013) Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27:73–83
10. Gouba N, Raoult D, Drancourt M (2014) Eukaryote culturomics of the gut reveals new species. *PLoS ONE* 9:e106994
11. Hamad I, Raoult D, Bittar F (2016) Repertory of eukaryotes (eukaryome) in the human gastrointestinal tract: taxonomy and detection methods. *Parasite Immunol* 38:12–36
12. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD (2013) Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS ONE* 8:e66019
13. Jandú JJ, Moraes Neto RN, Zagnignan A, de Sousa EM, Brelaz-de-Castro MC, dos S Correia, da Silva MT, LCN (2017) Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. *Front Pharmacol* 8:671


14. Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegraki A, Kostrzewa M, Mares M, Taj-Aldeen SJ, Boekhout T (2013) Identification of medically relevant species of arthrocnidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:2491–2500
15. Kumamoto CA (2016) The fungal mycobiota: small numbers, large impacts. *Cell Host Microbe* 19:750–751
16. Land GA, Vinton EC, Adcock GB, Hopkins JM (1975) Improved auxanographic method for yeast assimilations: a comparison with other approaches. *J Clin Microbiol* 2:206–217
17. Larone DH (1987) Medically important fungi: a guide to identification. Elsevier, New York
18. Liu CM, Sergey S, Dwan MG, Abraham AG, Hsueh MAP, Huang YT, Busch JD, Lamit LJ, Gehring CA, Keim P, Price LB (2012) FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol* 12:255
19. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horre R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47:2912–2917
20. Martínez-Herrera EO, Frías-De-León MG, Duarte-Escalante E, del Carmen Jimenez-Martinez M, Acosta-Altamirano G, Rivera-Becerril A, Conchita Toriello M, del Rocio Reyes-Montes M (2016) Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments. *Ann Agric Environ Med* 23(2):264–269
21. Morales P, Brignardello J, Gotteland M (2010) The association of intestinal microbiota with obesity. *Rev Med Chil* 138:1020–1027
22. Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA (2015) Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12:77–87
23. Neu J (2015) Developmental aspects of maternal-fetal, and infant gut microbiota and implications for long-term health. *Matern Health Neonatol Perinatol* 1:6
24. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336:1262–1267
25. Richard ML, Lamas B, Liguori G, Hoffmann TW, Sokol H (2015) Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 21:656–665
26. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* 26:26050
27. Rodríguez MM, Pérez D, Chaves FJ, Esteve E, Marin-García P, Xifra G, Vendrell J, Jové M, Pamplona R, Ricart W, Portero-Otin M, Chacón MR, Real JMF (2015) Obesity changes the human gut mycobiome. *Sci Rep* 5:14600
28. Romano-Keeler J, Jörn-Hendrik W (2014) Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatr Res* 77:189–195
29. Schulze J, Sonnenborn U (2009) Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int* 106:837–842
30. Scupham AJ, Presley LL, Wei B, Bent E, Griffith N, McPherson M, Zhu F, Oluwadara O, Rao N, Braun N, Borneman J (2006) Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol* 72:793–801
31. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, Jousson O, Leoncini S, Pindo M, Renzi D, Rizzetto L, Stefanini I, Calabrò A, de Filippo C (2016) Altered gut microbiota in Rett syndrome. *Microbiome* 4:41
32. Strati F, di Paola M, Stefanini I, Albanese D, Rizzetto L, Lionetti P, Calabrò A, Jousson O, Donati C, Cavalieri D, de Filippo C (2016) Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Front Microbiol* 7
33. Suhr MJ, Hallen-Adams HE (2015) The human gut mycobiome: pitfalls and potentials—a mycologist’s perspective. *Mycologia* 107:1057–1073
34. Walker AW, Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2014) Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol* 22:267–274
35. Walter J, Ley R (2011) The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* 65:411–429
36. World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic (WHO Technical Report Series no. 894). World Health Organization, Geneva

APÊNDICE C- Capítulos de livro

AOLONIO, A. N. M., MACHADO, A. B. F. **Microbiologia Bucal e Aplicada. Cap. 2 Fungos.** 1. Ed. Editora Guanabara Koogan: 2018.

AOLONIO, A. N. M., MACHADO, A. B. F. **Microbiologia Bucal e Aplicada. Cap. 8 Antifúngicos Utilizados na Terapêutica.** 1. Ed. Editora Guanabara Koogan: 2018.

APÊNDICE D- Trabalho apresentado no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia




28º Congresso Brasileiro de Microbiologia
De 18 a 22 de Outubro de 2015 | Centro Sul - Centro de Convenções de Florianópolis | Florianópolis - Santa Catarina - Brasil

Certificada

Certificamos que o trabalho intitulado YEASTS IDENTIFICATION OF HUMAN ADULT GUT MICROBIOTA BY MALDI-TOF MS com a autoria de: BORGES, F.M., DE PAULA, T.O., SARMIENTO, M.A., M.A., FERREIRA-MACHADO, RESENDE, J. A., TAVELLA, P. G., OLIVEIRA, M.G., NASCIMENTO, T.C., SILVA, V. L., DINIZ, C. G foi apresentado na forma de pôster durante o 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro de Convenções de Florianópolis, na cidade de Florianópolis, SC, no período de 18 a 22 de outubro de 2015.


Profa. Dra. Marina Baquerizo
Presidente da SBM


Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldmann
1º Secretário

Apoio:



Organização:



Eventos simultâneos: III Simpósio de Fermentação Alcoólica - III Simpósio de Microorganismos Fotossintetizantes - IV Simpósio de Escherichia coli Luiz Rachid Tabulsi

APÊNDICE E- Trabalhos apresentados no VIII Congresso Brasileiro de Micologia



Certificada

VIII Certificamos que **BRASILEIRO**
FRANCIS MOREIRA BORGES

apresentou o resumo intitulado **DIVERSIDADE FÚNGICA CULTIVÁVEL DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA**, com autoria de *Francis Moreira Borges; Thais Oliveira de Paula; Thiago César Nascimento; Alessandra Barbosa Ferreira Machado; Isabela Vieira Toledo; Maria Luiza de Mello Pereira; Maycon Guerra de Oliveira; Vânia Lúcia da Silva; Cláudio Galuppo Diniz*, durante o VIII Congresso Brasileiro de Micologia, realizado na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, de 03 a 06 de Outubro de 2016.


Maria Alice Neves
Presidente do Evento


Rosane Hahn
Presidente da SBMy



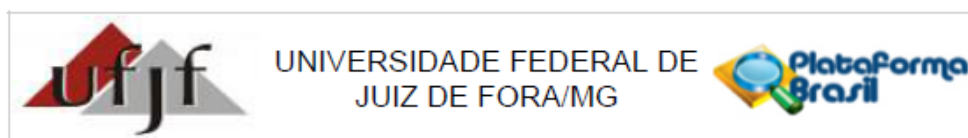
VIII Congresso Brasileiro de
MICOLOGIA

Centro de Cultura e Eventos - UFSC
Florianópolis - SC

APÊNDICE F - Outras atividades realizadas durante o período:

1. Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora: **Avaliação da diversidade fúngica intestinal humana de indivíduos obesos e eutróficos**. Juiz de Fora, MG, dezembro de 2016.
2. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da acadêmica do curso de Farmácia MARINA DE OLIVEIRA FAJARDO, INTITULADO: **Identificação de cocos Gram positivos isolados de amostras de queijo minas frescal**. Novembro de 2015.
3. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da acadêmica do curso de Farmácia PATRÍCIA GANIMI TAVELLA, INTITULADO: **Diversidade de fungos filamentosos cultiváveis a partir de espécimes fecais humanos**. Fevereiro de 2016.
4. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso do acadêmico do curso de Farmácia DOUGLAS MASSOTE PESTANA, INTITULADO: **Avaliação comparativa da estrutura da comunidade bacteriana intestinal, pelo uso da técnica de PCR-DGGE, em indivíduos eutróficos e com excesso de peso**. Julho de 2016.
5. Participação na co-orientação do estudante de graduação MAYCON GUERRA DE OLIVEIRA, intitulado: **Avaliação da diversidade fúngica leveduriforme no trato gastrointestinal humano por abordagem dependente de cultivo e identificação por espectrometria de massa**. Novembro de 2016.
6. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso do acadêmico do curso de Farmácia MAYCON GUERRA DE OLIVEIRA, intitulado: **Avaliação da diversidade fúngica leveduriforme no trato gastrointestinal humano por abordagem dependente de cultivo e identificação por espectrometria de massa**. Novembro de 2016.
7. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da acadêmica do curso de Farmácia PÂMELA DAS GRAÇAS XAVIER DOS SANTOS, INTITULADO: **Flavivírus e distúrbios neurológicos**. Novembro de 2017.

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Cláudio Galuppo Diniz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23895013.9.0000.5147

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 479.002

Data da Relatoria: 07/11/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



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

Página 02 de 02

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20 _____.

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

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

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

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

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

CEP: 36036-900

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. CLÁUDIO GALUPPO DINIZ

DEPTO. PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER, S/N - CAMPUS UNIVERSITÁRIO

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

E-MAIL: claudio.diniz@ufjf.edu.br

ANEXO C – Ficha de anamnese e dados cadastrais

FICHA DE ANAMNESE E DADOS CADASTRAIS

Entrevistador: _____

DATA: ____/____/____

DADOS PESSOAIS E SOCIÓ-DEMOGRÁFICOS

PRONTUÁRIO N°:

1. Nome:

2. Idade:

3. Sexo ()

4. Estado civil:

6. Endereço:

Bairro: _____

CEP: _____

7. Telefone:

Residencial: _____ Trabalho: _____ Celular: _____

8. Ocupação profissional atual:

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

11. Escolaridade:

() Ensino Fundamental completo () Ensino Fundamental Incompleto () Ensino Médio Completo

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

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

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

16. Atualmente você tem:

- | | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|----------------|
| a. Diabetes | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| b. Doenças do coração | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| c. Pressão alta | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| d. Insuficiência Renal | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| e. Doença no fígado | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| f. Depressão | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| g. Doença na tireóide | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| h. imunossupressão | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |
| i. soropositivo(a) para HIV | (0) Não | (1) Sim | (7) Não sabe |

j. Outras doenças: _____

17. Você faz uso de medicamento ou de suplemento?

(0) Não

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

(2) Hipoglicemiante oral.

(3) Insulina.

(4) Anti-depressivo.

(5) Dislipidêmicos.

(6) Antibióticos :

() antifúngico () antibacteriano () Antiprotozoário

Quanto tempo faz que tomou antibiótico por último?

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

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

DADOS SOBRE ESTILO DE VIDA

1. Você pratica alguma atividade física?

(0) Não (1) Sim. Se SIM, qual atividade? _____

Com que frequência? _____ vezes/semana. Quanto tempo gasta praticando atividade física? _____ horas

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

3. Você fuma?

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

4. Você costuma consumir bebida alcoólica?

(0) nunca

(1) diariamente

(2) 1 ou menos de uma vez por mês

(3) pelo menos 1 vez por semana

(4) 2 a 4 vezes por mês

(5) 2 a 3 vezes por semana

5. Qual o tipo de bebida você bebe?

(0) Nenhuma (1) cerveja (2) vinhos (3) destilados (cachaça, *whisky*, vodca, licor) (4) bebidas *ice*

6. Quantas doses contendo álcool você consome num dia típico quando você está bebendo? (0) Nenhuma (1) 1 a 2 doses (2) 3 a 5 doses (3) 6 a 8 doses (4) 10 ou mais

ANEXO D – Questionário quantitativo de frequência alimentar

Leite e derivados	Quantas vezes você come						Unidade	Pequena	Média	Grande	
	N	1	2	3	4	5					6
Leite integral	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Leite desnatado	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
logurte convencional	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
logurte light	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Queijo branco	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Queijo amarelo	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Requeijão convencional	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Requeijão light	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Pães e substitutos											
Pão francês	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Pão de forma convencional	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Pão de forma Light	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						
Pão integral	N	1	2	3	4	5	6	DSM			
		7	8	9	10						

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			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

Gorduras

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	DSM			
Azeite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cereais					
Arroz	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Arroz integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Arroz temperado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Batata Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Mandioca Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Batata cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Mandioca cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Angu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Milho Verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Macarrão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Lasanha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Macarrão instantâneo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

Coxinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Quibe	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Esfiha/ enroladinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cereais	Quantas vezes você come	Unidade	Pequena	Média	Grande
Empada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pastel	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Farinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				
Farofa	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Frutas					
Laranja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Maçã	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	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			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

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			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

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	D S M			

	7 8 9 10				
Repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Couve	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Couve flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cenoura crua	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Cenoura cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Abóbora cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Chuchu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Quiabo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Pepino	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
Sopas_____	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DSM			

ANEXO E – Ficha para dados antropométricos

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

ANEXO F- Classificação de alimentos com base no processamento industrial

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