UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

LUZANIA DOS SANTOS MARTINS

Análise da microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III submetidas a dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas

“ Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Ribeirão Preto

2019

LUZANIA DOS SANTOS MARTINS

Análise da microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III submetidas a dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Carla Barbosa Nonino

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desde trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Luzania Santos

Análise da microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III submetidas a dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas. Ribeirão Preto, 2019.

94 p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Barbosa Nonino.

1. Obesidade; 2. Microbiota Intestinal; 3. Dieta Hipocalórica; 4. *Proteobacteria*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARTINS, Luzania dos Santos

Análise da microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III submetidas a dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais Maria Valdelice Martins e
Osmar Martins, a minha irmã Luana Martins e ao meu
namorado Roberto Castro, por sempre estarem ao meu lado,
proporcionando amor, apoio, compreensão, conselhos, incentivo
na vida pessoal e profissional.*

Agradecimentos

Durante o desenvolvimento desse projeto foram muitas pessoas que acrescentaram, seja por meio de apoio, força, ensinamentos, visão ampliada do trabalho, auxílio técnico, conselhos, dentre outras contribuições. Posso afirmar que foi um trabalho em equipe, que gerou a mim crescimento profissional e pessoal. Agradeço...

À Deus por me dar saúde, paciência, inteligência emocional para realizar escolhas e colocar no meu caminho pessoas que foram essenciais para viabilizar esse projeto. À minha mãe Maria Valdelice, sempre com conselhos e preocupada com minha felicidade diante minhas escolhas. Ao meu pai Osmar, com suas palavras de incentivo e por sempre acreditar em mim. A minha irmã Luana pelo companheirismo e diversos momentos engraçados. Ao meu namorado Roberto por ajudar a me manter focada e determinada para realização desse sonho. À minha orientadora Carla Barbosa Nonino, por ter acreditado em mim, mesmo com todas dificuldades dessa trajetória, pela sua compreensão, pelo aprendizado, pelo exemplo de profissionalismo, trabalho em equipe e pelo carinho com que sempre me tratou. Obrigada por ter permitido a realização de um sonho.

À equipe do Laboratório de Estudo em Nutrigenômica (LEN): à Marcela Pinhel pelo apoio durante esta jornada passando seus conhecimentos e auxiliando na organização das etapas desse trabalho; à Driele Quinhoneiro pelo auxílio no início do projeto; ao Bruno Parenti, por sempre ser muito atencioso, me auxiliando durante a coleta e com análises estatísticas, com muita responsabilidade e com um bom humor contagiante; ao Heitor

Bernardes pela atenção, risos e auxílio na finalização do projeto; à Carolina Welendorf pela troca de experiência durante esta trajetória e pela ajuda.

À Letícia Wolf, Rayane Foglietti, Flávia Ferreira e Gabriel Franco, por sempre estarem dispostos a troca de experiência e a ajudar.

À Carolina Nicoletti, por compartilhar seu conhecimento, auxiliando em momentos cruciais do projeto, coleta e redação da dissertação.

À Cristiana Cortes, que sempre se mostrou muito atenciosa e companheira, desde o início dessa jornada, disposta a ajudar e passar seus conhecimentos, apoiando em questões técnicas e pessoais, e se tornando uma grande amiga.

À Natalia Yumi, pelos ensinamentos nas etapas de análises e escrita, uma parceira que gerou ensinamentos de extrema importância na minha vida pessoal e profissional, se tornando uma amiga muito especial.

À enfermeira Maria do Rosário Del L. Unamuno e à Dra. Vivian Marques Miguel Suen pelo auxílio no período da coleta de dados. Ao professor Roberto Martínez por permitir a utilização dos laboratórios de microbiologia (HCRP) para o armazenamento das amostras e etapas iniciais das análises.

À Daniela Carlos Sartori, pela orientação durante as análises da microbiota intestinal; ao Prof. Dr. João Santana da Silva por possibilitar a realização de uma parcela das análises no Laboratório de Imunoparasitologia (FMRP-USP).

Ao secretário Emerson Quirino de Oliveira do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela atenção e apoio ao decorrer dessa etapa.

Às participantes deste estudo pela disponibilidade e paciência em nome da Ciência.

Às minhas amigas Mariana Angélica Souza e Larissa Franzin, pela amizade, risos, apoio, conselhos, disponibilidade em qualquer horário do dia no auxílio em relação à dissertação.

Ao meu amigo Andrez Felipe, pela sua atenção, risos e troca de experiências em relação a análises.

Aos meus amigos Jean Andrade, Ana Paula Sanches, Priscila Orati, Juliane Andrade, Graciele Sgobin, Stella Andrade, Kelly Andrade, Patrícia Contrí, Riana Viegas, Gabriela Salim, por sempre torcerem por mim, pelos conselhos, risos, e por fazerem a minha caminhada pela vida sempre mais leve.

Aos membros da Diretoria do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Wilson Salgado Junior, Rita de Cássia Osório, Alexandre Figueiredo e à responsável técnica do Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Adálida Martins, por permitirem adequações dos meus horários de trabalho para viabilizar minha presença na realização de disciplinas, participações de reuniões e coletas durante o período do mestrado.

Agradeço à Rita de Cássia Osório e Alexandre Figueiredo pelos conselhos que proporcionaram crescimento profissional e pessoal, os quais, indiretamente, contribuíram para realização desse projeto.

*“Há um grande desejo em mim
de sempre melhorar.*

Melhorar, é o que me faz feliz”

Ayrton Senna

Resumo

RESUMO

MARTINS L. S. Análise da microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III submetidas a dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas. 94f. 2019. - Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.

A obesidade é considerada uma doença multifatorial e pode envolver, em sua gênese, aspectos genéticos, metabólicos, ambientais, psicológicos e socioeconômicos. O crescimento expressivo da incidência mundial da obesidade desencadeia o surgimento contínuo de novas pesquisas em relação a esse tema e, nesse contexto, estudos recentes sugerem que a microbiota intestinal é um fator que pode contribuir com o desenvolvimento desta doença. Assim, existe a premissa que a alteração da composição da microbiota intestinal pode ser influenciada pelo estado nutricional (obesidade x eutrofia) e pela qualidade da alimentação. O presente estudo teve como objetivos: i. comparar a proporção dos filos predominantes da microbiota intestinal *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* entre mulheres com obesidade grau III e mulheres eutróficas, e ii. investigar o impacto de uma dieta hipocalórica para perda de peso na composição da microbiota intestinal. Estudo prospectivo longitudinal, no qual foram selecionadas 20 mulheres com média de idade $33\pm 3,1$ anos, as quais foram divididas em dois grupos: Grupo Intervenção (GI): 10 mulheres com obesidade grau III (Índice de Massa Corporal (IMC) $>40 \text{ kg/m}^2$) que foram submetidas à intervenção nutricional (dieta hipocalórica) durante 8 semanas e Grupo Controle (GC): 10 mulheres eutróficas (IMC entre 18,5 a $24,9 \text{ kg/m}^2$). No GI, as coletas foram realizadas antes e após oito semanas da intervenção (GI) e, no GC em um único momento. Em cada momento, foram aferidos o peso e estatura; realizado o cálculo do IMC, análise composição corporal, taxa metabólica de repouso, consumo alimentar, glicemia e lipidograma, e coleta de amostra fecal. A análise da composição da microbiota intestinal em relação à abundância relativa dos *Filos* foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Após oito semanas de dieta hipocalórica, houve redução do peso ($119,5\pm 10,3$ para $114,9\pm 10,2 \text{ kg}$), IMC ($43,6\pm 2,4$ para $41,9\pm 2,6 \text{ kg/m}^2$), massa corporal gorda (MG) ($62,4\pm 7,5$ para $58,9\pm 7,7 \text{ kg}$), triglicérides (TG) ($143,2\pm 60,9$ para $117,94\pm 48,3 \text{ mg/dL}$). Evidenciou-se que mulheres com obesidade apresentam menor abundância dos filos pesquisados em relação às eutróficas. Ainda, a dieta hipocalórica promoveu diminuição da abundância relativa do filo *Proteobacteria* ($p=0,017$), o qual apresentou correlações positivas com a porcentagem de ingestão de lipídio total ($r=0,669$, $p=0,049$), ômega 6 em gramas ($r=0,669$, $p=0,049$). Conclui-se que a intervenção com dieta hipocalórica foi eficaz na redução de peso ($p=0,001$), IMC ($p=0,001$), MG ($p=0,001$), e TG ($p=0,001$), e na modulação da microbiota intestinal, com a diminuição do filo *Proteobacteria*.

Palavras-chave: obesidade; dieta hipocalórica; microbiota intestinal; *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.

Abstract

ABSTRACT

MARTINS L. S. Analysis of the intestinal microbiota in obese women submitted to a hypocaloric diet and in normal weight women. 2019. 94f. Dissertation (Master's degree) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.

Obesity is considered a multifactorial disease and it may involve, in its genesis, genetic, metabolic, environmental, psychological and socioeconomic aspects. The expressive growth of a worldwide incidence of obesity triggers the continual emergence of new researches on this subject and, in this context, recent studies have suggested that the intestinal microbiota is a factor that may contribute to the development of this disease. Thus, there is the premise that the changes in the composition of the intestinal microbiota can be influenced by the nutritional status (obesity x eutrophy) and by the diet quality. The present study aimed at: i. comparing the proportion of the predominant phyla of the intestinal microbiota *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* among degree III obese women and eutrophic women, and ii. investigating the impact of a low-calorie diet for weight loss on the intestinal microbiota composition. This was a longitudinal prospective study in which 20 women at the average age of 33 ± 3.1 years old were selected and divided into two groups: Intervention Group (IG): 10 women with grade III obesity (Body Mass Index (BMI) $> 40 \text{ kg / m}^2$) who were submitted to a nutritional intervention (a low-calorie diet) for 8 weeks, and the Control Group (CG): 10 eutrophic women (BMI from 18.5 to 24.9 kg / m^2) who were not submitted to any intervention. In the IG, sampling was carried out before and after the eight-week intervention (IG) and in the CG it was carried out only in a single moment. At each sampling, weight and height were checked; BMI was calculated, body composition was analyzed, resting metabolic rate, food intake, fasting blood glucose, and lipidogram tests were performed, and fecal sample collected. The analysis of the intestinal microbiota composition in relation to a relative abundance of every phyla was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). After eight weeks of a low-calorie diet, some of the observed results were weight reduction (119.5 ± 10.3 to $114.9 \pm 10.2 \text{ kg}$), BMI (43.6 ± 2.4 to $41.9 \pm 2.6 \text{ kg / m}^2$), fat body mass (FM) (62.4 ± 7.5 to $58.9 \pm 7.7 \text{ kg}$), triglycerides (TG) (143.2 ± 60.9 to $117.94 \pm 48.3 \text{ mg / dL}$). It was evidenced that obese women present a lower abundance of the studied phyla in relation to the eutrophic ones. Moreover, the low-calorie diet promoted a decrease in the relative abundance of *Proteobacteria* phylum ($p=0,017$), which presented positive correlations with the intake of percentage of total lipids ($r= 0,669$, $p=0,049$) and of grams of omega 6 ($r= 0,669$, $p=0,049$). It was concluded that the intervention with a low-calorie diet was effective in reducing Weight ($p=0,001$), BMI ($p=0,001$), FM ($p=0,001$) and TG ($p=0,001$) and in modulating the intestinal microbiota, by reducing *Proteobacteria* phylum.

Key-Words: obesity; low-calorie diet; intestinal microbiota; *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma de recrutamento e agrupamento dos pacientes do grupo intervenção	35
Figura 2.	Delineamento experimental do estudo	37
Figura 3.	Aparelho de Bioimpedância Elétrica e posicionamento dos eletrodos segundo protocolo do fabricante	38
Figura 4.	Exame de calorimetria indireta para avaliação da taxa metabólica de repouso	40
Figura 5.	Fluxograma das pacientes com obesidade elegíveis para o estudo e processo de adesão a estudo	47
Figura 6.	Análise da abundância relativa do filo <i>Firmicutes</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas	51
Figura 7.	Análise da abundância relativa do filo <i>Bacteroidetes</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas	52
Figura 8.	Análise da abundância relativa do filo <i>Actinobacteria</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas.	53
Figura 9.	Análise da abundância relativa do filo <i>Proteobacteria</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas.	54
Figura 10.	Análise da abundância relativa do filo <i>Verrucomicrobia</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas.	55
Figura 11.	Análise da abundância relativa razão <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> em mulheres com obesidade grau III pré e pós 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica e em mulheres eutróficas.	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Valores de referências IMC para adultos segundo Organização Mundial da Saúde (OMS 1995-1997)	37
Quadro 2.	Equação de JAKICIC (1998) para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade	39
Quadro 3.	Equação de Weir (1949) para estimativa da taxa metabólica de repouso	40
Quadro 4.	Equações de Weir (1949) para estimativa da taxa metabólica de repouso e de Frayn (1983) para estimativa de oxidação de glicose e lipídio	41
Quadro 5.	Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo	41
Quadro 6.	Sequência dos <i>primers</i> padronizados utilizados no ensaio de PCR em tempo real	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Antropometria, composição corporal, taxa metabólica em repouso e oxidação de substrato de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção com dieta hipocalórica e de mulheres eutróficas	47
Tabela 2.	Indicadores bioquímicos de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção dieta hipocalórica e de mulheres eutróficas	48
Tabela 3.	Dados de consumo alimentar de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção dieta hipocalórica e de mulheres eutróficas	49
Tabela 4.	Análise de correlação da abundância relativa dos filos com variáveis do consumo alimentar	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácidos graxos
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AR	Abundância relativa
CA	Circunferência abdominal
CH	Carboidratos
Cm	Centímetros
COT	Colesterol Total
CT	Do inglês: <i>Cycle threshold</i>
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DP	Desvio Padrão
F/B	Razão de <i>Firmicutes</i> por <i>Bacteroidetes</i>
FC	<i>Folha Change</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
G	Grama
GC	Grupo Controle
GI	Grupo Intervenção
GI pré	Grupo intervenção no momento antes da intervenção
GI pós	Grupo intervenção no momento pós intervenção
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HDLc	Do inglês: <i>High density lipoproteins cholesterol</i>
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LDLc	Do inglês: <i>Low lipoproteins cholesterol</i>
LIP	Lipídios
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB4	Leucotrienos B4
MCM	Massa corporal magra
MG	Massa gorda
m ²	Metro ao quadrado
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXICHO	Oxidação de carboidrato
OXILIP	Oxidação de lipídios
OXI TOTAL	Oxidação total
PGE2	Prostaglandinas E2

PTN	Proteína
qPCR	Do inglês: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
QR	Quoeficiente Respiratório
IR24h	Inquérito de Recordatório 24 horas
R	Correlação
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicérides
TLR4	Toll-like receptor 4
TMR	Taxa metabólica de repouso
TXA2	Tromboxana A2
VCT	Valor calórico total
VET	Valor energético total
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VO ₂ rep	Volume de oxigênio consumido durante o repouso
VCO ₂ rep	Volume de gás carbônico
16S rRNA	16 S <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Obesidade	21
1.2 Microbiota intestinal	22
1.2.1 Filos <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> e <i>Verrucomicrobia</i>	24
1.2.2 Interação entre microbiota intestinal e consumo alimentar	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
4.1 Casuística	32
4.2 Critérios de inclusão	32
4.3 Critérios de não inclusão	32
4.4 Critérios de exclusão	33
4.5 Delineamento do estudo	33
4.6 Procedimentos de avaliação	34
4.6.1 Antropometria	34
4.6.2 Avaliação da Composição Corporal	36
4.6.3 Consumo alimentar	37
4.6.4 Avaliação da Taxa Metabólica de Repouso (TMR)	37
4.6.5 Avaliação bioquímica	39
4.7 Protocolo de intervenção com dieta hipocalórica	39
4.7.1 Seleção do plano alimentar	39
4.7.2 Intervenção	40
4.8 Análise da microbiota intestinal	40
4.8.1 Coleta de material fecal	40
4.8.2 Extração e avaliação do DNA	41
4.8.3 PCR em tempo real (qPCR)	41
4.9 Análise estatística	42
5. RESULTADOS	45

6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICES.....	84
ANEXOS.....	93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, doenças respiratórias crônicas e cânceres, foram responsáveis por 68% de um total de 38 milhões de mortes ocorridas no mundo em 2012, apresentando um aumento de 14,6 mortes comparado ao ano de 2000 (WORD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Em relação à prevalência de DCNT na população brasileira, o valor é preocupante, o qual é de aproximadamente 40% (57,4 milhões de pessoas) segundo Pesquisa Nacional de Saúde realizada no ano 2014. A obesidade integra o grupo de DCNT e é compreendida como um agravo de caráter multifatorial (e.g. fatores genéticos, metabólicos, ambientais, psicológicos e socioeconômicos) (OMS, 2000) que culmina no acúmulo de gordura corporal (WORD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Inúmeras consequências associadas ao crescimento alarmante da prevalência da obesidade fizeram com que essa doença se tornasse um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que a prevalência seja maior que 600 milhões de indivíduos em todo mundo, podendo este número aumentar para 700 milhões de acordo com as projeções para 2025. No Brasil, a obesidade cresceu 60% em um período de 10 anos (de 11,8% em 2006 para 17,7% em 2016 segundo VIGITEL, 2016). Apesar da pesquisa mais atual ter indicado estabilização da frequência de adultos com obesidade (18,9% em 2017), a prevalência de obesidade na população brasileira continua alarmante (VIGITEL, 2017).

Paralelamente, os sinais e sintomas da obesidade podem ser agravados conforme o grau de classificação proposto pela OMS: obesidade grau I para Índice de Massa Corporal (IMC) entre 30 e 34,9 kg/m²; obesidade grau II para IMC de 35 a 39,9 kg/m² e obesidade grau III para IMC $\geq$ 40 kg/m². Ainda, a obesidade grave (grau III) resulta em implicações para além dos aspectos físicos, afetando atividades da vida diária, psicoemocionais, sociais e ocupacionais, o que pode ter influência significativa na qualidade de vida (CARVALHO et al., 2012; TAYLOR et al., 2013).

Diante de sua complexidade, a obesidade tem sido alvo de diversos estudos, sejam eles de investigação fisiopatológica (MULLER et al., 2013; YU et al., 2015; TAUQEER et al., 2018) ou de avaliação de resultados de intervenções terapêuticas (FOTHERGILL et al., 2016; SORGENTE et al., 2017; SUZAN et al., 2018). No âmbito da fisiopatologia, o balanço energético positivo crônico decorrente da elevada ingestão energética e reduzida prática de atividade física pode ser destacado como principal fator etiológico. Uma influência importante no balanço energético positivo é o estresse e a ansiedade associados à ingestão alimentar que segundo a Diretriz de Obesidade (2017), essa associação é mais frequente em mulheres. Soma-se ainda aos fatores etiológicos da obesidade, componentes neuroendócrinos, genéticos, dietéticos, culturais, psicossociais, além da composição da microbiota intestinal a qual é uma perspectiva que vem sendo intensamente estudada nos últimos anos (LEY et al., 2006).

Em relação às estratégias de tratamento, podem ser citadas as abordagens de aconselhamento nutricional, atividade física, estratégias comportamentais, medicamentosas, cirúrgicas e novos tratamentos coadjuvantes (TAUQEER et al., 2018). Sabe-se que é necessário um balanço negativo para proporcionar a redução ponderal, assim, o tratamento clínico com dieta e restrição energética é a principal opção terapêutica. Há evidências significativas que a orientação de déficit energético de 500 kcal à 1.000 kcal diárias para redução de peso acarreta em redução de 0,5 a 1 kg por semana (Diretriz de Obesidade, 2016). Somado à essa referência, pode-se considerar eficaz uma redução de peso maior ou igual à 1% do peso corporal por mês (PAPPAS et al., 2010). Além do foco quantitativo e qualitativo de alimentos ingeridos no tratamento dietético, é imprescindível o planejamento de estratégias comportamentais que estimulem a adesão ao tratamento para redução de peso e manutenção do mesmo.

1.2 Microbiota intestinal

A superfície corporal externa (pele, unhas, lábios) e interna (cavidades nasais, cavidade oral, pulmonar, trato gastrointestinal, aparelho urogenital) do corpo humano são colonizadas por um conjunto diversificado de microrganismos denominado microbiota humana, que por sua vez é composta por bactérias, vírus,

fungos e protozoários (RIBEIRO, 2017). A maioria significativa da microbiota humana é representada por bactérias sendo os filos predominantes: *Bacteroidetes* (9,5%), *Proteobacteria* (11,9%), *Firmicutes* (34,3%) e *Actinobacteria* (36,6%), os quais juntos representam 92,3% da microbiota humana (CASTELLO et al., 2009). A composição da microbiota pode variar em diferentes regiões do corpo humano, sendo que a microbiota intestinal apresenta maior diversidade e complexidade de microrganismos, competindo apenas com a cavidade oral (VERSALOVIC AND HALL, 2018).

A estabilidade da microbiota intestinal é alcançada a partir dos dois anos de idade e, no adulto, existe uma estabilidade considerável, entretanto, a composição da microbiota do idoso torna-se mais instável (GROVE et al., 2010; MILLIONM, 2013). Esta estabilidade é influenciada por fatores como sexo, idade, genética do hospedeiro, uso de medicamentos (como por exemplo, antibióticos) e surgimento de enfermidade dentre outros fatores. Entretanto, as proporções dos filos bacteriano podem variar entre indivíduos (POPENKO et al., 2016), devido a uma série de fatores, como a genética do hospedeiro, o estado nutricional, hábitos alimentares, estado de saúde e prática de exercício físico (GUARDER et al., 2003; LEY et al., 2008; MACHADO et al., 2015; CODELLA et al., 2018).

A microbiota intestinal e seu hospedeiro estabelecem uma relação simbiótica, na qual as bactérias possuem capacidade de assimilar e modificar componentes do seu ambiente e produzir novas moléculas que podem ser benéficas ou maléficas para seu hospedeiro (VERSALOVIC AND HALL, 2018). Essa relação entre a microbiota e o hospedeiro influencia significativamente a proteção das mucosas intestinais, o metabolismo (inclusive na degradação de alimentos), a fisiologia e a função imune do hospedeiro, de modo que a consequência desta associação pode ser positiva ou negativa para saúde e/ou para doença (BACKEHED et al., 2004; BIN et al., 2017; AZAD et al., 2018). Nesse sentido, evidências apontam uma relação entre a disbiose com o desenvolvimento de doenças respiratórias, cardiovasculares, diabetes *mellitus* e obesidade (GOMES et al., 2018).

1.2.1 Filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*

Taxonomia é a ciência de classificação de organismos e engloba os domínios (eucariotos, procariotos e archeas) e, em seguida, em ordem decrescente de táxons são o filo, classe, ordem, família, gênero, espécie e subespécies (Don J. Brenner et al., 2001).

O filo *Firmicutes* caracteriza-se por ser um filo de bactérias gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas (CANNAVAM, 2007). Os microrganismos desse filo são considerados estrategistas, pois se multiplicam rapidamente no meio em que vivem em resposta a grande oferta de nutrientes (ATLAS E BARTHA, 1997) e, além disso, são seres celulóticos e desempenham papel importante na degradação de celulose (SANTOS et al., 2010). Ainda, estudos recentes evidenciaram proporção significativamente maior do filo *Firmicutes* nas pessoas com obesidade quando comparados com indivíduos eutróficos (TURNBAUGH et al., 2009; AGUIRRE et al., 2014; KOLIADA et al., 2018). Por outro lado, autores relataram proporção semelhante dos dois filios em indivíduos com diferentes estados nutricionais (obesidade e eutrofia) (DUCAN et al. 2011).

O segundo filo mais abundante na microbiota intestinal é o *Bacteroidetes* (POPENKO et al., 2016), o qual é composto por bactérias gram-negativas que apresentam características quimiorganotróficas, sendo capazes de degradar polímeros como celulose, pectina (KUIRCHAM, 2002) e glicanos (RASTMANESH, 2011). A relação entre estado nutricional e a proporção de *Bacteroidetes* ainda é conflitante na literatura, visto que a maior prevalência dessas bactérias foi associada a eutrofia (AGUIRRE et al. 2014), como também nenhuma associação foi encontrada (DUCAN et al., 2011).

Juntos, o filo *Firmicutes* e o filo *Bacteroidetes* apresentam prevalência significativa na composição da microbiota intestinal (SEARS, 2005). Estudos, ao investigarem a razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, demonstraram um valor aumentado dessa razão nos grupos de indivíduos com obesidade quando comparados com eutróficos (MARTHUR AND BARLOW, 2015; KOLIADA, et al 2017). Porém, os estudos ainda são conflitantes, pois outros autores não observaram diferença entre tais grupos (DUNCAN, MILLION, et al, 2013; HU, et al, 2015).

Outro filo que pode ser associado à influência na microbiota intestinal é o filo *Actinobacteria*, composto por bactérias gram positivas (Koliada et al., 2017) as quais apresentam diversas funções metabólicas. Dentre tais propriedades pode-se citar a habilidade na fermentação de oligossacarídeos no trato gastrointestinal, principalmente os não digeríveis pelo ser humano (Ventura et al., 2007). Tal habilidade pode contribuir para aumento da absorção de energia pelo hospedeiro.

O filo *Proteobacteria* (gram-negativas) é caracterizado por bactérias com alta taxa de crescimento (ZILLI et al., 2003) e é considerado um dos quatro filos mais predominantes na microbiota intestinal. A abundância desse filo foi associada a distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes *mellitus* dentre outros (RIZZATTI et al., 2017). Tais fatos são premissas para investigações comparativas da composição da microbiota em relação ao estado de saúde e desenvolvimento de doenças relacionadas às diferenças de abundância dessas bactérias.

Ainda, o filo *Verrucomicrobia* é composto por bactérias gram-negativas aeróbias ou anaeróbias facultativas, sendo que abundância desse filo foi observada em indivíduos eutróficos (ZHANG et al. 2009) e possui menor representatividade nos indivíduos com obesidade. Além disso, evidências sugerem que esse filo esteja associado a proteção da barreira intestinal devido a espécie *Akkermansia muciniphila*, a qual possui habilidade de aumentar a espessura do muco que reveste o epitélio intestinal, propiciando maior resistência e maior proteção contra inflamações (EVERARD et al. 2013).

1.2.2 Interação entre microbiota intestinal e consumo alimentar

O consumo alimentar pode influenciar a composição da microbiota intestinal, e esta por sua vez pode interagir com o metabolismo do seu hospedeiro (MACHADO et al., 2015). Vários autores hipotetizam que esse efeito é decorrente da qualidade e quantidade dos nutrientes ofertados pela dieta e sua capacidade de proporcionar um ambiente favorável ou desfavorável às bactérias intestinais (MACFARLANE et al., 1992; FLINT et al., 2006, RASTMANESH et al., 2011). Assim, a capacidade de interação, adaptação e competição da microbiota por

substrato determina a sua presença e abundância no ecossistema intestinal (MACHADO et al., 2015).

Esta complexa interação entre consumo alimentar, microbiota e hospedeiro evidencia a habilidade das bactérias atuarem na recuperação de energia da dieta, na transformação de carboidratos digeríveis, aminoácidos e vitaminas (WIKOFF et al., 2009) e na participação em vias metabólicas do hospedeiro (MACHADO et al. 2015). Backhed et al. (2004) foram pioneiros na constatação da relação entre dieta, microbiota e obesidade ao observar que camundongos apresentaram maior peso que camundongos *germ-free*, mesmo após ingerirem quantidade de calorias menores.

Nessa mesma linha, Jumertz et al. (2011) observaram, em seres humanos, que o aumento da ingestão calórica (2400 kcal para 3400 kcal, porcentagem de macronutrientes similar) alterou a composição da microbiota intestinal, com aumento da abundância do filo *Firmicutes* e diminuição do filo *Bacteroidetes*. Concordantemente, David et al., (2014) mostraram aumento da abundância de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes* com a diminuição ingestão energética. Somado a esses achados, um estudo recente mostrou a associação entre uma dieta rica em lipídios e abundância elevada de *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* na microbiota intestinal. Ainda, a abundância desses filos e dos *Firmicutes* e *Proteobacteria* foi inversamente proporcional ao consumo de fibras (DARIA et al., 2018). Entretanto, apesar da similaridade dos resultados dos estudos supracitados, a literatura ainda é conflitante em relação à interação de dieta, microbiota intestinal e hospedeiro.

Considerando os conceitos supracitados e as recentes evidências, o presente estudo visa testar a hipótese de que a composição da microbiota intestinal com relação aos filos depende de acordo com o estado nutricional (eutrofia ou obesidade) e que uma dieta hipocalórica é capaz de modular a microbiota intestinal de mulheres com obesidade.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

O aumento da ocorrência da obesidade com o consequente risco de desenvolvimento de comorbidades possui impacto negativo na qualidade de vida e elevação do índice de mortalidade, tornando-se uma preocupação de saúde pública mundial. São conhecidas várias estratégias para o tratamento desta doença, o qual objetiva a perda significativa de peso e, dentre elas, destaca-se o uso de dietas hipocalóricas para induzir o balanço energético negativo. Entretanto, sabe-se que muitas estratégias terapêuticas apresentam insucesso, principalmente a longo prazo. Considerando que a obesidade é uma doença de etiologia multifatorial e de extrema complexidade, lacunas ainda são existentes e necessitam serem desvendadas. A partir das evidências recentes é possível observar um crescente interesse em relação à investigação da composição da microbiota intestinal e sua relação com o estado nutricional e de saúde dos indivíduos. Assim, a investigação da ingestão alimentar, estado nutricional e sua influência na simbiose entre microbiota intestinal e seu hospedeiro é um campo de estudo que poderá elucidar mecanismos envolvidos na obesidade. A possibilidade dessa modulação intestinal pode ser uma nova ferramenta para ser associada aos tratamentos já conhecidos para redução de peso, o que pode auxiliar a atingir resultados mais eficazes e duradouros no combate à obesidade.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a abundância relativa dos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* presentes e da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* na microbiota intestinal entre mulheres com obesidade grau III e mulheres eutróficas e investigar o impacto de uma dieta hipocalórica para perda de peso nesse ecossistema.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar variáveis antropométricas, bioquímicas, de composição corporal, taxa metabólica de repouso, oxidação de substratos e consumo alimentar de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção com dieta hipocalórica e com mulheres eutróficas;
- ✓ Avaliar a abundância relativa dos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* de e razão *Firmicutes/Bacteroidetes* de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção com dieta hipocalórica e de mulheres eutróficas; e correlacioná-las com as demais variáveis avaliadas.

Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este estudo foi realizado com uma amostra de conveniência, a qual foi composta de mulheres com obesidade grau III e mulheres eutróficas. O recrutamento e distribuição da amostra está ilustrado na Figura 1. Realizou-se divulgação do estudo com auxílio da Assessoria de Imprensa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), por meio de envio de *e-mail* institucional aos funcionários do HC, por publicação na intranet e rede social e rádio da referida universidade (Apêndice A). Aqueles indivíduos que demonstraram interesse entraram em contato com a pesquisadora responsável pelo e-mail disponibilizado na divulgação. Assim, realizou-se uma triagem via e-mail e contato telefônico, na qual selecionou-se voluntários que se enquadravam nos critérios de inclusão.

As pacientes selecionadas foram esclarecidas quanto ao protocolo da pesquisa e, em seguida, realizaram a leitura e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo processo HCRP nº 8982/2016 do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Apêndices B e C).

4.2 Critérios de inclusão

Participantes do sexo feminino, com idade entre 24 e 45 anos, na qual apresentavam obesidade grau III (para inclusão no Grupo Intervenção-GI) ou eutrofia (para inclusão no Grupo Controle-GC).

4.3 Critérios de não inclusão

Em ambos os grupos não foram incluídas mulheres em terapia antibacteriana; em uso de medicamento anti-inflamatório, antifúngico e/ou antialérgico; em uso de chá verde, probióticos e/ou prebióticos; gestantes; lactantes; tabagistas; etilistas; em tratamento quimioterápico; com histórico de cirurgia do trato gastrointestinal, como por exemplo: retirada da vesícula biliar e/ou cirurgia bariátrica; com diagnóstico de doenças do trato gastrointestinal; com

diagnóstico de diabetes *mellitus*, hipotireoidismo ou hipertireoidismo; e mulheres que já se encontravam em período de alteração de hábito alimentar.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pacientes que durante o acompanhamento iniciaram o uso de medicamentos que pudessem interferir na microbiota intestinal ou aquelas que não seguiram o protocolo de acompanhamento nutricional (dieta hipocalórica no GI).

Figura 1. Fluxograma de recrutamento e agrupamento dos pacientes do grupo intervenção.

4.5 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo, no qual o GI foi avaliado antes (GI pré) e após oito semanas (GI pós) de uma intervenção com dieta hipocalórica e o GC foi avaliado em apenas um momento, como ilustrado na Figura 2. Em todos os momentos e em ambos os grupos foram realizadas medidas de peso, altura, circunferência abdominal; cálculo do IMC; análise da composição

corporal, taxa metabólica de repouso, consumo alimentar; coleta de sangue periférico para análise dos indicadores bioquímicos (glicemia e lipidograma) e coleta de fezes para análise composição da microbiota intestinal. Ainda, no período pré, foi entregue a todas as participantes do GI um esquema alimentar, o qual deveria ser seguido pelo período de oito semanas (intervenção com dieta hipocalórica).

4.6 Procedimentos de avaliação

Com o objetivo de evitar vieses, todos procedimentos de avaliação foram realizados em um único dia e por uma equipe previamente treinada. As orientações de preparos para os procedimentos foram realizadas por entrega de um impresso (Apêndice D) e reforçadas por telefone um dia antes da avaliação. No momento das avaliações/exames, as pacientes estavam em jejum de 12 horas.

4.6.1 Antropometria

Para avaliação antropométrica foram coletadas medidas de peso (kg), altura (m), IMC (kg/m^2) e circunferência abdominal (CA).

A aferição do peso foi realizada em balança digital Filizola® do tipo plataforma, com capacidade para 300 kg e precisão de 0,2 kg. As pacientes foram pesadas com roupas leves e sem calçados.

Para medida da altura foi utilizada haste vertical com graduação de 0,5 cm. As pacientes foram medidas sem calçados, em posição ortostática.

O IMC foi calculado pela fórmula: $\text{IMC} = \text{Peso}/(\text{Altura})^2$, considerando valores de peso em quilogramas e de altura em metros. Foi utilizada a classificação da obesidade dos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995-1997) segundo demonstrado no Quadro 1.

Figura 2. Delineamento experimental do estudo.

#: indica análise do consumo alimentar, antropometria, composição corporal, calorimetria indireta, coleta de sangue para exames de lipidograma e glicemia, coleta de fezes para análise da microbiota intestinal;

▲: indica entrega do plano alimentar.

Quadro 1. Valores de referência de IMC para adultos segundo Organização Mundial da Saúde (OMS 1995-1997)

Classificação	IMC (kg/m ²)
Eutrofia	18,5-24,9
Sobrepeso	25-29,9
Obesidade I	30-34,9
Obesidade II	35-39,9
Obesidade III	>40

IMC: Índice de Massa Corpórea; kg: quilogramas; m²: metro ao quadrado.

A CA foi medida passando-se uma fita métrica inextensível com graduação de 0,1 mm na maior circunferência do abdômen em torno da cicatriz umbilical.

4.6.2 Avaliação da Composição Corporal

A composição corporal foi avaliada pela técnica da bioimpedância elétrica, sendo utilizado o aparelho modelo Quantum BIA 101 Q – RJL System (Figura 3). No momento do exame, as pacientes encontravam-se sem adornos ou demais objetos metálicos, roupas leves, e com a bexiga urinária vazia e fora do período menstrual. As pacientes foram orientadas a permanecer em decúbito dorsal, com as pernas e braços em paralelo e afastados do corpo.

De acordo com a recomendação do fabricante, quatro eletrodos adesivos foram colocados na superfície da pele. A mesma foi previamente higienizada com álcool, sendo que dois adesivos foram colocados na mão direita e outros dois no pé direito (Figura 3), sendo um na superfície dorsal do punho direito entre os ossos ulnar e rádio, outro no terceiro metacarpo, outro na superfície anterior do tornozelo direito entre as porções proeminentes dos ossos e o último na superfície dorsal do terceiro metatarso. Uma corrente elétrica de baixa amplitude (entre 500 a 800 A) e frequência de 50 kHz foi aplicada nos eletrodos distais da mão e do pé.

Figura 3. Aparelho de Bioimpedância Elétrica e posicionamento dos eletrodos segundo protocolo do fabricante.

Os valores de resistência (R) e reactância (X_c) foram colocados em fórmulas específicas para análise da composição corporal de pessoas com obesidade, obtendo-se assim os valores de massa corporal magra (MCM) (JAKICIC; WING; LANG, 1998). Para obtenção dos valores de massa gorda (MG),

foi subtraída a quantidade de MCM (kg) do peso total (kg). A fórmula para o cálculo da MCM está apresentada no Quadro 2.

Quadro 2. Equação de JAKICIC (1998) para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade.

$$\text{MCM (kg)} = 2,68 + (0,2 \times A^2 / R) + 0,19 \times P + 2,55 \times \text{etnia} + 0,1157 \times A.$$

Para etnia considerou-se:

Caucasianos: 0

Afrodescendentes: 1

A: altura em metros; P: peso em quilogramas; R: resistência em Ohm; MCM: massa corporal magra.

4.6.3 Consumo alimentar

Para análise do consumo alimentar foram coletados três Inquéritos Recordatório de 24 horas (IR24h) em cada tempo. O primeiro e o segundo IR24h foram realizados por telefone em dias anteriores à avaliação, e o terceiro presencialmente, no dia da coleta; totalizando dois IR24h de dias semanais e um correspondente a um dia de final de semana. Com auxílio do *software Dietwin®*, foram realizadas análises quantitativas dos IR24h, na qual observou-se a ingestão diária de calorias, macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) e de micronutrientes (vitamina B12). Considerou-se como consumo final a média derivada dos três IR24h.

4.6.4 Avaliação da Taxa Metabólica de Repouso (TMR)

As pacientes foram orientadas a não ingerir café, bebida energética ou chá e não realizar exercícios físicos 24 horas antes da avaliação. Durante o exame, as pacientes permaneceram em decúbito dorsal, em silêncio, evitando se mexer, porém, vígil. As avaliações foram efetuadas em ambiente termo neutro, com umidade e temperatura controladas (Figura 4).

Utilizou-se o aparelho de Calorimetria Indireta modelo *QUARK-RMR* (COSMED, Roma, Itália). A TMR foi mensurada durante 30 minutos, sendo que os 10 minutos iniciais foram descartados com o objetivo de garantia da homogeneidade dos dados. Mensurou-se o volume de oxigênio consumido

durante o repouso (VO_2) e o volume de gás carbônico produzido durante o repouso (VCO_2) para posterior cálculo da TMR. A equação de Weir foi adotada para calcular a demanda energética dos indivíduos em repouso e está representada no Quadro 3.

Figura 4. Exame de calorimetria indireta para avaliação da taxa metabólica de repouso.

Quadro 3. Equação de Weir (1949) para estimativa da taxa metabólica de repouso.

Taxa metabólica de repouso (kcal/ dia): $3,941VO_2(L/min) + 1,106VCO_2(L/min)$

VO_2 : volume de oxigênio; VCO_2 : volume de gás carbônico.

Para estimar a oxidação de glicose e lipídio foi utilizada a equação de Frayn. A fração de nitrogênio na urina não foi considerado, pois de acordo com Weir (1949), o erro máximo de exclusão é inferior a 1 em 500 (Quadro 4).

Quadro 4. Equações de Weir (1949) para estimativa da taxa metabólica de repouso e de Frayn (1983) para estimativa de oxidação de glicose e lipídio.

Taxa metabólica de repouso (kcal/dia): $3,941 \text{ VO}_2 \text{ (L/min)} + 1,106 \text{ VCO}_2 \text{ (L/min)}$

Taxa de oxidação de glicose (g/min): $4,55 \text{ VCO}_2 \text{ (L/min)} - 3,21 \text{ VO}_2 \text{ (L/min)}$

Taxa de oxidação de lipídio (g/min): $1,67 \text{ VO}_2 \text{ (L/min)} - 1,67 \text{ VCO}_2 \text{ (L/min)}$

VO₂: volume de oxigênio; VCO₂: volume de gás carbônico.

4.6.5 Avaliação bioquímica

Foram realizadas análises dos indicadores bioquímicos de glicemia, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL_c), lipoproteína de baixa densidade (LDL_c) e triglicerídeos (TG). Foram adotados os valores de referência padronizados no HCFMRP-USP, descritos no Quadro 5.

Quadro 5. Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Exames Bioquímicos	Valores de Referência	Método de Análise
Glicemia (mg/dL)	70 – 99	Enzimático
Colesterol (mg/dL)	< 200	Colorimétrico
HDL _c (mg/dL)	> 35	Colorimétrico
LDL _c (mg/dL)	< 130	Colorimétrico
TG (mg/dL)	<150	Colorimétrico

4.7 Protocolo de intervenção com dieta hipocalórica

4.7.1 Seleção do plano alimentar

Foram estruturados seis planos alimentares com valor calórico de 1.100 kcal, 1.200 kcal, 1.300 kcal, 1.400 kcal, 1.500 kcal e 1.600 kcal, com distribuição de macronutrientes conforme recomendações da literatura (CARVALHO & DUTRA, 2014).

- ✓ **Carboidratos:** 55% a 60% do valor energético total (VET), sendo menos de 20% de absorção simples.

- ✓ **Gorduras:** 20% a 25% do VET, sendo gordura saturada <7% do VET; 10% do VET de ácidos graxos polinsaturado; 13% do VET de ácidos graxos monoinsaturado e até 300 mg de colesterol total.
- ✓ **Proteínas:** 15% a 20% do VET.

Cada plano alimentar foi acompanhado pela lista de substituição de alimentos, com o objetivo de favorecer a adesão à intervenção.

A escolha do plano alimentar para cada participante, foi baseada na avaliação da calorimetria indireta. Do resultado do valor do gasto energético em repouso foi subtraído 30%, e selecionado um dos 6 planos alimentares previamente estruturados.

4.7.2 Intervenção

As pacientes deste grupo foram orientadas a seguir uma dieta hipocalórica durante oito semanas. Foram realizados retornos quinzenais na Unidade Metabólica do HCFMRP-USP, sempre conduzidos pela nutricionista pesquisadora responsável. Em cada retorno foram abordados dados de comportamento alimentar, dificuldades no seguimento do plano alimentar e ênfase nas mudanças positivas em relação à alimentação.

As participantes foram orientadas a entrar em contato, via e-mail ou telefone, com a nutricionista para esclarecer qualquer eventual dúvida durante a participação no projeto.

4.8 Análise da microbiota intestinal

4.8.1 Coleta de material fecal

O material utilizado para análise da microbiota intestinal foi a amostra fecal. Foram entregues, a cada paciente, um par de luvas, uma espátula coletora, um recipiente coletor estéril, saco plástico com fecho hermético, caixa isotérmica e foi realizada a orientação verbal e entregue a orientação impressa com esclarecimentos sobre o procedimento de coleta da amostra (Apêndice D).

Após a entrega do material coletado para a pesquisadora, este foi transportado imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-

USP, onde a amostra foi fracionada e armazenada em criotubos estéreis e em seguida congelada em freezer à -80 °C. Tais procedimentos foram realizados em até no máximo 24 horas após a coleta da amostra, sendo que as amostras que ultrapassaram esse período foram descartadas.

4.8.2 Extração e avaliação do DNA

Extraíu-se DNA das amostras de fezes armazenadas no freezer - 80 °C. Para o processo de extração de DNA foi utilizado o kit *QIAamp® Fast DNA Stool Mini*, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação da concentração e pureza das amostras de DNA fecal foi realizada por meio do equipamento espectrofotômetro *NanoDrop Lite* (*ThermoScientific*) em três comprimentos de onda, utilizando as razões 260/280 e 260/230nm.

4.8.3 PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa dos diferentes filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foi realizada em triplicata pelo método de PCR em tempo real com o uso do aparelho *Step One Plus Real Time PCR System®* (*AB Applied Biosystems*).

Para a reação foi utilizado o kit *Promega®* e *primer* salvo específicos para cada filo (Quadro 6). Como normalizador foi utilizado *primer* para a sequência de rRNA 16S universal. O gene 16S rRNA é uma sequência amplamente utilizada para estudar filogenia e taxonomia bacteriana, pois é o gene referência mais comum entre o taxon Eubacteria. Para cada reação foram utilizados *primers* na concentração de 10 µM, *master mix*, 20 ng de DNA, água ultrapura e a reação foi padronizada para um volume final de 10 µL.

Após as reações, o *threshold* foi ajustado manualmente para 0,1 para garantir que os dados coletados fossem na fase exponencial da curva. Todos os resultados foram avaliados com auxílio do software *Step One Plus®* (*Thermo Fisher Scientific*). Os *Cts* (*cycle threshold*) foram extraídos e para determinar a abundância relativa dos filos de interesse foi utilizado o método de $2^{-\Delta C_t}$ (PARK, et al, 2016). Após normalização com o grupo controle, a abundância foi representada

sob a forma de *fold change*. Esta metodologia foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia, sob a orientação da Professora Doutora Daniela Carlos Sartori.

Quadro 6. Sequência dos <i>primers</i> padronizados utilizados no ensaio de PCR em tempo real.	
Grupo	Sequência
<i>Firmicutes</i>	F-ATGTGGTTTAATTCTGAAGCA
	R-AGCTGACGACAACCATGCAC
<i>Bacteroidetes</i>	F-GTTTAATTTCGATGATACGCGAG
	R-TTAASCCGACACCTCACGG
<i>Actinobacteria</i>	F-TGTAGCGGTGGAATGCGC
	R-AATTAAGCCACATGCTCCGCT
<i>Proteobacteria</i>	F-CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG
	R-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
<i>Verrucomicrobia</i>	F-TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT
	R-CAGTTTTYAGGATTTCTCCGCC
rRNA 16S universal	F-AACAGGATTAGATACCCTGGTAG
	R-GGTTCTTCGCGTTGCATC

4.9 Análise estatística

A estatística descritiva foi composta por valores de média e desvio-padrão (DP). Primeiramente, foi testada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Em seguida, para comparação das variáveis clínicas do grupo controle em comparação com o GI pré e GI pós foi realizado o teste t para amostras independente. Para comparação dos filos dos pacientes do GC com os pacientes GI pré e GI pós foi utilizado o teste Mann Whitney. A comparação das variáveis antes e após a intervenção foi realizada por meio do teste t pareado e a variável abundância dos filos pelo teste de Wilcoxon. Por fim, foram realizadas

correlações entre os grupos de variáveis clínicas, ingestão alimentar e abundância de filos. A significância estatística (p -valor) foi convencionada em valores inferiores a 5% ($p < 0,05$). As análises citadas foram todas realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 20.0 [Inc. Chicago. IL]).

Resultados

5. RESULTADOS

Foram incluídas no presente estudo, 20 mulheres, as quais foram divididas em dois grupos: 1. Grupo Intervenção composto por 10 mulheres com obesidade grau III, com média de idade $33,7 \pm 3,1$ anos, submetidas a dieta hipocalórica durante 8 semanas e 2. Grupo Controle composto por 10 mulheres eutróficas, com média de idade de $32,4 \pm 3,2$ anos.

Figura 5. Fluxograma das pacientes com obesidade grau III incluídas e processo de adesão ao estudo

Na Tabela 1 estão descritas as variáveis de antropometria, composição corporal, TMR e oxidação de substratos de GI e GC. Mulheres com obesidade no GI pré e GI pós apresentaram maiores valores de peso, IMC, MLG, MG, CA, TMR, VO_2 , VCO_2 , OXILIP/dia e menores valores de TMR/kg que GC. Não foram observadas diferenças significativas em relação a TMR/MLG, QR, OXICHO g/dia e OXI TOTAL g/dia.

No GI, após a intervenção, houve diminuição significativa de peso, IMC, MG (kg), porém, as diferenças se mantiveram em relação ao GC.

Tabela 1. Antropometria, composição corporal, taxa metabólica em repouso e oxidação de substrato de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

Variáveis	GI pré (n= 10)	GI pós (n= 10)	GC (n=10)
Idade (anos)	33,7±3,1	33,8±3,2	32,4± 3,2
Peso (kg)	119,5±10,3 ^a	114,9±10,2 ^{ab}	61,7±4,6
IMC (kg/m ²)	43,6±2,4 ^a	41,9±2,6±2,6 ^{ab}	22,1±1,4
CA (cm)	123,3±10,8 ^a	121,4±7,1 ^a	73,8±3,5
MG (kg)	62,4±7,5 ^a	58,9±7,7 ^{ab}	17,9±3,7
MG (%)	51,9±2,5 ^a	50,9±2,7 ^a	28,8±3,7
MLG (kg)	57,1±3,8 ^a	55,9±3,6 ^a	43,8±3,0
MLG (%)	48,1±2,5 ^a	49,1±2,7 ^a	71,2±3,7
TMR (kcal/dia)	1976,3±256,1 ^a	1942,1±288,9 ^a	1452,6±146,7
TMR/kg	16,6±2,3 ^a	17,1±2,9 ^a	23,9±2,3
TMR/MLG	32,2±8,39	33,7±5,7	33,2±8,4
VO ₂ (L/min)	0,298±0,031 ^a	0,297±0,026 ^a	0,2020,034
VCO ₂ (L/min)	0,221±0,029 ^a	0,220±0,022 ^a	0,165±0,026
QR	0,7±0,07	0,7±0,06	0,8±0,09
OXICHO (g/dia)	57,2±143,5	47,2±115,8	136,4±117,1
OXI LIP (g/dia)	186,3±57,3 ^a	185,370,8±6 ^a	94,4±52,5
OXITOTAL (g/dia)	254,2±89,5	254,1±76,1	230,8±74,4

Valores apresentados em média ± desvio padrão; IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal, MG: massa gorda, MLG: massa livre de gordura; TMR: taxa metabólica de repouso; VO₂: volume de oxigênio; VCO₂: volume de dióxido de carbono, QR: quociente respiratório, OXI CHO: oxidação de carboidrato; OXI LIP: oxidação de lipídio; OXI TOTAL: oxidação total; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo pré intervenção.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados referentes aos indicadores bioquímicos. Observou-se no GI, no momento basal, menores de HDL quando comparado ao GC e maiores valores de glicemia, colesterol total, LDL, TG quando comparado ao GC. Após a intervenção com dieta hipocalórica, houve redução das concentrações séricas de HDL e TG, porém, as concentrações de colesterol total e LDL permaneceram maiores e de HDL menores quando comparadas ao GC.

Tabela 2. Indicadores bioquímicos de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

Variáveis	GI pré (n= 10)	GI pós (n= 10)	GC (n=10)
Glicemia (mg/dL)	95,2±18,1 ^a	91,5±14,9	80,9 ±7,9
Col total (mg/dL)	196,0 ±25,7 ^a	184,0±41,7 ^a	159,7± 20,2
HDL (mg/dL)	45,9±6,8 ^a	41,2±8,0 ^{ab}	59,2±13,4
LDL (mg/dL)	121,4±27,8 ^a	119,4±23,9 ^a	83,5±16,7
TG (mg/dL)	143,2 ±60,9 ^a	117,94±48,3 ^b	84,6±42,4

Valores apresentados em média ± desvio padrão. Col total: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicérides; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo pré intervenção.

Na Tabela 3 estão descritos os dados referentes ao consumo alimentar. Observou-se maior consumo de ácido graxo saturado e de fibras no GC quando comparado ao GI pré. Ao comparar ingestão alimentar entre GI pré e GI pós, observou-se diminuição significativa da ingestão energética, de carboidrato, proteína, ácido graxo saturado, ácido graxo poliinsaturado e ômega 6. Ainda, GI pós apresentou menor consumo energético, de carboidrato, proteínas, lipídio total, ácido graxo saturado, poliinsaturado que GC, além de maior valor em relação á ômega 3 em relação à GC.

Tabela 3. Dados de consumo alimentar de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

Variáveis	GI pré (n= 10)	GI pós (n= 10)	GC (n=10)
Energia (Kcal)	1679,9±279,0	1140,5±196,1 ^{ab}	1741,5±194,1
Carboidrato (g)	196,4±43,7	127,6±23,1 ^{ab}	200,2±37,2
Carboidrato (%VCT)	47,2±4,7	46,2±10,6	47,1±7,2
Proteína (g)	78,4±15,7	63,0±10,4 ^{ab}	74,9±11,7
Proteína(%VCT)	18,8±2,5	22,7±4,7	18,4±4,0
Lipídio total (g)	62,1±9,1	41,3±23,7 ^a	69,8±16,8
Lipídio total (%VCT)	32,2±6,9	30,7±13,1	33,5±7,2
Colesterol (mg)	269,5±64,5	240,7±110,3	301,7±80,7
AG saturado (g)	22,4±5,2 ^a	13,7±8,4 ^{ab}	28,0±5,1
AG monoinsaturado (g)	19,9±5,2	15,9±12,01	21,8±3,6
AG poli-insaturado (g)	9,9±3,1	6,0±2,2 ^{ab}	11,0±3,8
Ácido linolênico (g)	0,7±0,2	0,5±0,3 ^a	1,1±0,6
Ácido linoleico (g)	6,9±1,9	4,4±1,9 ^b	6,9±3,7
Ácido oleico (g)	4,8±2,8	4,2±2,0	6,3±3,9
Fibras(g)	9,3±3,5 ^a	11,4±2,5	12,3±2,5
Vitamina B12 (µg)	5,05±5.0	2,32±1,6	2,85±1,1

Valores apresentados em média ± desvio padrão. VCT: Valor calórico total; AG: ácido graxo; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo pré intervenção.

As Figuras 6 a 11, demonstram a abundância relativa dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e a razão F/B do GI pré, GI pós e GC. Na Figura 6, observou-se maior abundância relativa do filo *Firmicutes* em GC quando comparado ao GI pré. Porém, pode-se observar que após a intervenção, a diferença da abundância relativa do filo *Firmicutes* no GI deixou de ser significativa em relação ao grupo controle.

Figura 6. Análise da abundância relativa do filo *Firmicutes* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III após da intervenção.

A Figura 7, demonstra maior abundância relativa do filo *Bacteroidetes* no GC quando comparado ao GI pré e ao GI pós. Em relação à intervenção, não houve diferença da abundância relativa do GI pré comparado ao GI pós.

Figura 7. Análise da abundância relativa do filo *Bacteroidetes* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré da intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III pós da intervenção.

A abundância relativa do filo *Actinobactéria* no GC quando comparado ao GI pré e ao GI pós é apresentada na Figura 8. Além disso, pode-se observar nesta figura que ao comprar GI pré e GI pós, não houve diferença da abundância relativa.

Figura 8. Análise da abundância relativa do filo *Actinobacteria* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré da intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III após da intervenção.

Por outro lado, pode-se observar na Figura 9, uma diminuição significativa do filo *Proteobacteria* após 8 semanas de intervenção com dieta hipocalórica. Ao considerar a comparação GC com GI pré e com GI pós, houve maior abundância relativa com GC.

Figura 9. Análise da abundância relativa do filo *Proteobacteria* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré da intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III após da intervenção.

Na Figura 10, o GC apresentou maior Abundância relativa do filo *Verrucomicrobia* quando comparada com GI pré e GI pós. Não apresentou diferença entre os GI pré e GI pós.

Figura 10. Análise da abundância relativa do filo *Verrucomicrobia* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré da intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III após da intervenção.

Em relação a razão *F/B*, não foi identificada diferença significativa entre os três grupos (Figura 11).

Figura 11. Análise da abundância relativa da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* de mulheres com obesidade grau III pré e pós intervenção com dieta hipocalórica (GI) e de mulheres eutróficas (GC).

AR: abundância relativa; FC: *fold change*; GI pré: mulheres com obesidade grau III pré da intervenção; GI pós mulheres com obesidade grau III após da intervenção

As correlações da abundância relativa dos filos com variáveis do consumo alimentar estão descritas na Tabela 4. No GI pré, houve correlação negativa da abundância relativa do filo *Actinobacteria* com a porcentagem de carboidrato ingerido. No GI pós observou correlação positiva entre o filo *Actinobacteria* com ingestão de fibras, entre o filo *Firmicutes* com a porcentagem de proteína consumida, entre o filo *Proteobacteria* com porcentagem de lipídios e com ômega 6 ingeridos.

Tabela 4. Análise de correlação da abundância relativa dos filos com variáveis do consumo alimentar.

Variáveis	F	B	A	P	V	F/B
Gl pré	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r(p)	r (p)
Energia	-0,201(0,604)	0,268(0,486)	-0,594(0,092)	-0,393(0,295)	0,067(0,864)	0,151(0,699)
CHO (%)	0,017(0,966)	0,335(0,379)	-0,929(0,001)	-0,36(0,342)	0,234(0,544)	0,368(0,330)
Variáveis	F	B	A	P	V	F/B
Gl pós	r (p)	r (p)	r (p)	r (p)	r(p)	r (p)
Energia	-0,502(0,168)	-0,351(0,354)	0,100(0,797)	0,435(0,242)	-0,479(0,230)	-0,075(0,847)
Fibras (g)	0,586(0,097)	0,452(0,222)	0,787(0,012)*	0,218(0,574)	-0,24(0,568)	0,561(0,116)
PTN (%)	0,736(0,024)*	0,469(0,203)	0,285(0,485)	-0,435(0,242)	0,455(0,257)	0,444(0,232)
LIP (%)	0,469(0,203)	0,452(0,222)	-0,117(0,764)	0,669(0,049)*	-0,24(0,568)	0,042(0,915)
Ômega 6 (g)	0,485(0,185)	0,485(0,203)	0,201(0,604)	0,669(0,049)*	-0,479(0,23)	0,042(0,915)

F: *Firmicutes*; B: *Bacteroidetes*; A: *Actinobacteria*; P: *Proteobacteria*; V: *Verrucomicrobia*; F/B: razão *Firmicutes* e *Bacteroidetes*; r: coeficiente de correlação; CHO (%): porcentagem de carboidrato consumido; g: gramas; PTN (%): porcentagem de proteína consumida; LIP (%): porção de lipídios consumido; Energia: energia total ingerida em quilogramas; p<0,05; * correlação significativa.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Foi evidenciado no presente estudo que uma dieta hipocalórica, com redução de 30% do VET em relação ao gasto energético, foi capaz de reduzir o peso e a concentração de gordura corporal e melhora de alguns parâmetros bioquímicos. Ainda, foi demonstrado que mulheres eutróficas apresentaram maior abundância de todos os filos estudados em relação a mulheres com obesidade e que a intervenção com dieta hipocalórica é capaz de alterar a composição da microbiota intestinal de mulheres com obesidade, devido a redução do filo *Proteobacteria*.

O indivíduo com obesidade constantemente é julgado por parte da sociedade por não ter força de vontade de se alimentar de maneira saudável (CINTRA et al., 2011). Tal juízo de valor pode ser considerado equivocado e superficial, e faz-se importante ressaltar que a obesidade é considerada uma doença crônica e multifatorial sendo apontada pela OMS como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (CINTRA et al., 2011). Nesse sentido, esse estudo propiciou auxílio no entendimento de mecanismos moleculares que podem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento da obesidade.

A intervenção dietética com restrição calórica é uma estratégia amplamente utilizada para redução de peso (JAIME et al. 2015). No presente estudo, realizou-se uma intervenção dietética por oito semanas com restrição calórica de 30% da TMR. Tal restrição foi escolhida com base em resultados da literatura, principalmente, no estudo de Thomas et al., (2014), o qual apresentou resultado positivo quanto à redução de peso aplicando restrição calórica de 25% da TMR. O valor de restrição de 30% da TMR corrobora também com as orientações das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Obesidade, (2016) que recomenda, para estratégias de redução de peso, um *déficit* de 500 a 1.000 kcal do VET e com valor mínimo de oferta de 1.000kcal a 1.200 kcal diárias.

A educação alimentar e nutricional pode promover mudanças substanciais no estado de saúde do indivíduo, pois fornece orientação para promoção da alimentação saudável (SANTOS, 2005; FELIPPE, et al, 2011). Com base nisso, muitas vezes a adesão efetiva a um programa de intervenção dietética é decorrente da maneira que ocorre a transmissão de informações para os pacientes, entretanto, esse fator não é suficiente para garantir mudanças de

comportamento alimentar (MARTINS, 2014). Sendo assim, nesse estudo foi fornecido às pacientes um material impresso contendo o plano alimentar hipocalórico individualizado e a lista de substituições de alimentos; bem como realizou-se acompanhamento nutricional periodicamente. A educação alimentar promovida em diversos encontros entre paciente – nutricionista (no caso a pesquisadora) teve papel diferencial e de grande importância nesse estudo, pois foi a estratégia motriz para desencadear mudanças de comportamento. O profissional de nutrição é capaz de considerar os fatores individuais e promover adequação, auxiliando na resolução de problemas e maximizando a adesão à intervenção nutricional (MARTINS, et al., 2014).

Assim, outro aspecto importante do presente estudo foi o acompanhamento ambulatorial, o qual possibilitou uma supervisão indireta sobre a adesão das pacientes ao tratamento. Deste modo, o grupo de intervenção nutricional foi iniciado com 18 mulheres e finalizou com 10 mulheres, correspondendo a uma taxa de adesão de 55%. Esse número foi semelhante ao encontrado por Guimarães et al. (2010) que ao avaliarem diferentes métodos de acompanhamento nutricional, encontraram taxa de desistência maior que 50%. A complexidade da adesão a um programa nutricional envolve diversos fatores, podem ser destacados: 1. problemas pessoais, 2. ausência de apoio familiar e 3. desmotivação frente à resultados da redução de peso durante o tratamento (INELMEN, et al.2005).

Devido ao fato de que programas com dietas restritivas possuem uma baixa adesão em longo prazo (DIRETRIZ BRASILEIRA DE OBESIDADE, 2016), foi determinado o período de oito semanas de duração da intervenção e a inclusão de orientações por meio da educação alimentar e nutricional. Ressalta-se que no final do período de intervenção, as pacientes foram orientadas a interromper o seguimento do plano alimentar proposto e a continuar com a aplicação das orientações sobre alimentação saudável trabalhas nos retornos ambulatoriais em suas rotinas.

No presente estudo, observou-se que a expectativa de algumas pacientes quanto à redução de peso era muito elevada e, assim, a maioria das pacientes esperava uma maior perda de peso no período da intervenção. Considerando tal aspecto, sugere-se que este pode ter sido um fator desmotivador, o qual influenciou a desistência das pacientes frente a intervenção proposta. Outro

motivo de desistência pode ter sido a rotina sobrecarregada dessas mulheres, já que apresentavam alta demanda de trabalho e afazeres domésticos.

Foram incluídas na casuística do presente estudo apenas as pacientes que não praticavam atividade física, pois a prática de exercícios físicos poderia ser um viés (CODELLA, et al. 2018) em relação ao principal objetivo da pesquisa, que foi investigar o impacto da intervenção dietética na microbiota intestinal. Considerando tal fator, as participantes foram orientadas a manterem-se fisicamente inativas até o final do estudo; entretanto foram encorajadas a iniciar a prática de atividade física após o término do acompanhamento nutricional, caso não houvessem restrições físicas.

Considerando as variáveis antropométricas e de composição corporal, estas se apresentaram significativamente maiores no grupo GI quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado, a intervenção proporcionou diminuição significativa do peso ($p=0,001$), IMC ($p=0,001$) e gordura corporal ($p=0,001$). A redução de peso neste estudo, $4,6 \pm 2,9$, está de acordo com a referência da Diretriz de Obesidade, 2016, abordando a diminuição de peso, com metas realistas, de 0,5 a 1 kg por semana. Ainda sobre a variável peso, apesar de sua redução significativa, não houve redução da MLG, o que já é considerado um efeito benéfico para a saúde, pois a MLG está diretamente relacionada não só com a manutenção ou aumento da TMR, mas também com funções endócrinas, imunes e metabólicas (CARBONE et al. 2017). É importante ressaltar que a não alteração da MLG observada nas pacientes do presente estudo possa ter influenciado na manutenção da TMR.

Por outro lado, segundo Siervo et al. (2015), a perda da MLG reflete na diminuição do gasto energético e pode contribuir para o reganho de peso. Em ambos períodos do estudo (antes e após a intervenção) mulheres com obesidade apresentaram maiores valores de TMR que mulheres eutróficas, o que pode ser explicado pelo seu maior volume corpóreo (FARIA et al. 2012). Porém, ao considerar TMR por kg de peso, este quadro inverte sendo o GC com maior gasto por kg de peso, resultado também observado no estudo de Oliveira, et al (2017).

No presente estudo foram observados valores menores de CA nas mulheres eutróficas quando comparado aquelas com obesidade ($p=0,001$). Além disso, foi observado que a intervenção não propiciou redução da CA, o que pode estar relacionado com características individuais dessas pacientes, como

distribuição da gordura corporal e regulação endócrina, já que a intervenção contribuiu para a redução significativa do peso e da gordura corporal. A importância de monitorar a CA na prática clínica é devido a sua associação com a gordura visceral e inflamação crônica (SAMPAIO et al., 2007), hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (CARMLENKE et al., 2013). Segundo Telles et al., 2018, o aumento da CA associa-se com diminuição da qualidade de vida. Além do mais, no estudo de Bueno, et al. (2013) foi observado impacto negativo da CA na autoestima de mulheres brasileiras de grandes centros urbanos.

As variáveis respiratórias VO_2 e VCO_2 apresentaram diferenças entre GI (pré e pós) e GC, sendo os maiores valores presentes no GI ($p=0,001$). Porém, o QR (quociente respiratório) que é calculado pela razão entre as variáveis VO_2 e VCO_2 , o qual é utilizado na identificação do substrato energético (lipídio, proteína e carboidrato) oxidado no momento da avaliação da TMR, no GI pré e GI pós os resultados foram $0,7 \pm 0,07$ e $0,7 \pm 0,06$, respectivamente. Tal resultado evidencia predomínio de oxidação de lipídios (Dias, et al. 2010). Assim, evidenciou que o grupo GI apresentou maior oxidação de gordura que GC (QR: $0,8 \pm 0,09$). Observou-se maiores concentrações séricas em todos os parâmetros bioquímicos analisados nas pacientes com obesidade, com exceção do HDL. Esses resultados eram esperados visto que já está bem estabelecido que o padrão alimentar de indivíduos com obesidade é fator de risco para o aumento de lipídios séricos e de glicemia (JUNG & CHOI, 2014). A intervenção dietética teve impacto positivo no TG e na glicemia, que alcançaram valores semelhantes ao GC (grupo cujos indicadores bioquímicos foram considerados dentro dos valores de referência adotados). Esses resultados corroboram com outros estudos realizados em mulheres com obesidade, os quais foi observado uma redução das concentrações séricas de TG após seguimento de dieta hipocalórica (JAIME et al. 2015; MAGKOS, et al. 2016). Tais achados sustentam a popularidade e eficiência da estratégia de intervenção hipocalórica para redução de peso, que mesmo sendo discreta, promove alterações em parâmetros bioquímicos, que contribuem para a saúde cardiovascular do indivíduo.

Em contrapartida, observou-se, também, redução significativa dos valores de HDL após a intervenção. Segundo Leança, et al. (2015), 50% da variação do

HDL são decorrentes da prática de atividade física, hábito alimentar (ingestão de gorduras), peso corporal, tabagismo e alcoolismo, e outros 50% à fatores genéticos. Apesar de ter sido realizada orientação de ingestão alimentar balanceada, as pacientes tinham autonomia para fazer suas escolhas o que pode ter influenciado nesses resultados. Além disso, apesar de não ter sido identificado uma redução no consumo de AG ômega 3 no GI pós, foi observado uma menor ingestão de AG poli-insaturados no GI pós, que pode ter influenciado na redução do HDL (YANAI et al., 2015). Em adição, nesse estudo as pacientes incluídas não apresentavam hábito da prática de atividades física e foram orientadas, como mencionado anteriormente, a não realizarem pela possível interferência do exercício físico na microbiota intestinal.

A análise da ingestão energética do GI pré (1679 ± 279 kcal/dia), mostrou que esta não esteve de acordo com as variáveis antropométricas observadas, assim como foi semelhante ao valor médio da TMR encontrado no grupo controle ($1741,5 \pm 194,1$ kcal/dia). Tal resultado pode ser justificado por um possível sub relato por parte das pacientes com obesidade, o qual vem sendo discutido amplamente na literatura. Em 2007, Nonino et al. observaram uma média de ingestão calórica relatada de 2.100 kcal, e quando ofertado as pacientes um programa alimentar de 2.500 kcal, evidenciou-se redução do peso. Além disso, em uma série de estudos avaliando indivíduos com obesidade grave, candidatos a cirurgia bariátrica, observaram discrepância entre o consumo alimentar relatado e o excesso de peso existente (NICOLETTI, 2011; GIMENEZ, 2017, OLIVEIRA, 2017). O sub relato alimentar pode ser considerado multifatorial, pois envolve aspectos cognitivos e emocionais, como sentimento de culpa por preferir alimentos não saudáveis (KRESTCH, M.J.K. 1999).

A comparação da ingestão alimentar antes e após a intervenção dietética mostrou diminuição do consumo energético total ($p=0,004$), carboidratos ($p=0,006$), proteínas ($p=0,027$), ácidos graxos saturados ($p=0,029$), ácidos graxos poliinsaturados ($p=0,019$) sem diferença significativa para ômega 3. Tal resultado sustenta a adesão ao esquema alimentar equilibrado orientado às pacientes do GI, porém, houve diminuição na ingestão de ômega 6 ($p=0,022$).

A microbiota intestinal está diretamente relacionada com padrões alimentares e está envolvida em múltiplas funções fisiológicas do hospedeiro, como imunomodulação e nutrição e metabolismo, apresentando assim, papel

importante na manutenção da saúde (MACHADO, et al. 2015). Em relação à influência da microbiota intestinal na nutrição e metabolismo, destaca-se a capacidade de melhoria no aproveitamento energético de nutrientes que não são absorvidos durante a digestão. Ao atingirem o cólon, produtos da microbiota intestinal possibilitam a degradação de polissacarídeos da dieta que o hospedeiro não teria capacidade de degradar e absorver, melhorando assim a eficiência digestiva e influenciando o estado nutricional do indivíduo (CHO & BLASER, 2012). Por outro lado, mudanças na composição da microbiota intestinal como resultado do aumento crônico da ingestão energética que está associado à obesidade, podem provocar inflamação e alterações na permeabilidade intestinal (SANMIGUEL, et al. 2015). Dentre os microorganismos que compõem a microbiota intestinal, a grande maioria são bactérias, sendo os filos com maior abundância: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*, os quais foram escolhidos para esse trabalho devido sua representatividade na microbiota intestinal. Apesar, desses filos estarem presentes em todos os indivíduos, existe uma variação de abundância interpessoal e intrapessoal. Nesse contexto, diversos são os fatores que podem influenciar a microbiota intestinal humana, como por exemplo a genética do hospedeiro, o estado nutricional, estado de saúde, a prática de exercício físico e a ingestão de nutrientes (CHO & BLASER, 2012). Neste estudo foi analisada a influência do estado nutricional e de nutrientes específicos na alteração da composição da microbiota intestinal, bem como o efeito da dieta hipocalórica.

Com relação a intervenção hipocalórica, no presente estudo não foi encontrada a alteração da abundância relativa do filo *Firmicutes*. Resultados divergentes foram identificados por Díaz, et al. (2016), que observou uma diminuição na abundância relativa do filo *Firmicutes* associada à adesão da dieta mediterrânea. Considerando a complexidade da interação e a influência de uma diversidade de fatores como por exemplo a interação da microbiota com nutrientes específicos, entre os microorganismos que colonizam a mesma, e com o seu hospedeiro, pode ter implicado na ausência de alteração significativa em relação ao filo *Firmicutes* nesse estudo.

Porém, no GI pós houve correlação positiva entre a abundância do filo *Firmicutes* e a porcentagem de ingestão proteica ($r=0,736$; $p=0,024$). Resultados semelhantes foram identificados por Wang, et al. (2018), que associaram o

aumento significativo da abundância relativa do filo *Firmicutes* após suplementação proteica. Bactérias proteolíticas do cólon, como por exemplo as do gênero *Clostridium* que pertencem ao filo *Firmicutes* possuem a capacidade de degradar proteínas, assim, quanto maior a ingestão proteica, há possibilidade de maior concentração dessas bactérias na microbiota intestinal (MACFARLANE, et al. 1995).

E por fim, em relação à comparação do estado nutricional, observou-se maior abundância relativa do filo *Firmicutes* no grupo de mulheres com eutrofia em comparação a mulheres com obesidade, semelhante aos resultados encontrados por Scarpellini, et al. (2010).

Em relação ao filo *Bacteroidetes*, Díaz et al, 2016, observaram um aumento da abundância relativa desse filo associada a adesão à dieta mediterrânea. Porém, no presente estudo não foi vista alteração da composição do filo *Bacteroidetes* após intervenção nutricional, assim a complexidade de interação pode ser também uma explicação para anulação de resultados significativos.

Quando comparado GC com GI pré e GI pós, a maior abundância do filo *Bacteroidetes* estava presente no GC. Resultados similares são demonstrados na literatura (LEY et al, 2006; ARMOUGOM, et al, 2009) e, além disso, é observado que indivíduos com obesidade apresentam menor concentração de *Bacteroidetes* em relação a indivíduos eutróficos (CHO & BLASER, 2012). Um estudo recente, realizado em ucranianos, também identificou concentrações significativas menores de *Bacteroidetes* em indivíduos com obesidade quando comparado a indivíduos eutróficos (KOLIADA et al., 2017). Por outro lado, resultados divergentes foram encontrados por Scarpellini, et al. (2010), que observaram uma maior abundância do filo *Bacteroidetes* em mulheres com obesidade, o que mostra ainda não haver um consenso em relação ao comportamento desse filo.

Diversos estudos em humanos têm demonstrado consistentemente que a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* (*F/B*) está aumentada em indivíduos com obesidade em comparação com indivíduos eutróficos e que essa razão tende a reduzir com a perda de peso (SWEENEY & MORTON, 2013; MATHUR & BARLOW, 2015; BARLOW, YU & MATHUR, 2015). Por outro lado, alguns estudos falharam em identificar diferenças significativas na razão *F/B* em indivíduos com obesidade antes e após a perda de peso (DUNCAN et al., 2008; ZHANG et al., 2009; ISMAIL et al., 2011; HU et al., 2015). No presente estudo, não foi

identificada alteração na razão *F/B* após a intervenção e, apesar de não ter sido identificada diferença significativa entre os grupos, os resultados encontrados sugerem uma maior razão *F/B* no grupo GI pré e uma tendência de redução no grupo GI pós. Porém, são apenas sugestivos e é provável que o tempo de intervenção dietética não foi suficiente para influenciar na razão *F/B*.

Este estudo não mostrou diferença na abundância relativa de *Actinobacteria* entre os momentos antes e após a intervenção. Além disso, essa abundância foi maior em mulheres eutróficas do que aquelas com obesidade. Resultado sustentado por Legarrea et al. (2014), que referem maior abundância de *Bifidobacterium*, gênero significativo no filo *Actinobacteria*, em indivíduos eutróficos quando comparadas a indivíduos com excesso de peso. Porém, Turnbaugh, et al (2009), mostraram maior abundância do filo *Actinobacteria* em indivíduos obesos, fato que demonstra a ausência de consenso na literatura em relação à abundância desse filo.

Uma das funções primordiais da microbiota intestinal é o aproveitamento de energia a partir de compostos não digeríveis, como exemplos, os polissacarídeos não digeridos e as fibras dietéticas. Sabe-se que os carboidratos são os substratos mais utilizados pela microbiota intestinal (PAIVA & MANTOVANI, 2015). Do carboidrato total ingerido em uma dieta, os carboidratos simples como monossacarídeos e dissacarídeos, por serem absorvidos no jejuno proximal, se apresentam menos disponíveis aos microorganismos que colonizam o cólon. Entretanto, os polissacarídeos não digeríveis pelo hospedeiro atingem o cólon e podem ser metabolizados pela microbiota intestinal a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tais como butirato e propionato (PAIVA and MONTOVANI, 2015). Os AGCC servem como substrato energético para células epiteliais colônicas e para outras diversas funções metabólicas no organismo, destacando a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e integridade da mucosa intestinal (SEGAN et al., 2000).

As fibras dietéticas, podem ser utilizadas por diversos microorganismos da microbiota intestinal, sendo uma das principais espécies sacarolíticas, as *Bifidobactérias*, ordem pertencente ao filo *Actinobacteria*, que aumentam durante dietas ricas em carboidratos não digeríveis provenientes de grãos integrais e farelo de trigo (SINGH et al., 2017). Tal afirmação sustenta a correlação positiva da ingestão de fibras com o filo *Actinobacteria* observada no GI pós ($r= 0,787$;

$p=0,012$). Ainda, resultado semelhante foi observado no estudo de Dominianni et al. (2015), onde o aumento da ingestão de fibras foi associado ao aumento da proporção do filo *Actinobacteria*.

Além de extrair energia para si, a degradação e extração de energia da fibra pela microbiota também fornece energia para o hospedeiro e tal aproveitamento energético poderia favorecer o ganho de peso. Por outro lado, as fibras não utilizadas podem servir de auxílio para a redução de peso. Assim, a energia fornecida ao hospedeiro depende o tipo e da quantidade de fibras ingeridas (BLAUT et al., 2012).

No presente estudo, foi verificada uma correlação negativa entre o filo *Actinobacteria* e a porcentagem de ingestão de carboidrato ($r=-0,929$; $p=0,001$). É importante ressaltar que os carboidratos presentes em uma dieta, incluem os não digeríveis, que podem influenciar positivamente na proliferação da microbiota intestinal, e os digeríveis, que podem contribuir negativamente para a proliferação da microbiota intestinal (PAIVA & MANTOVANI, 2015). Com base nisso, se pode supor que a correlação positiva se refere a ingestão de carboidratos específicos (amido resistente e fibras), e a correlação negativa pode estar associada ao carboidrato total, que inclui os carboidratos simples. Não foi identificado na literatura nenhum estudo que realizou esse tipo de análise.

A homeostase da microbiota intestinal na obesidade ainda não está totalmente elucidada, mas a ingestão de dietas hiperlipídicas, principalmente rica em ácidos graxos saturados e em ácidos graxos ômega 6, tem sido proposta como um possível fator facilitador (BLEAU, et al. 2014). Mudanças na homeostase intestinal após a ingestão de dietas hiperlipídicas estão associadas a alterações na composição da microbiota intestinal e de peptídeos presentes na mucosa (SANZ & MOYA-PEREZ, 2014). Além disso, já é bem descrito na literatura que a dieta hiperlipídica está associada à ativação da sinalização de receptores do tipo Toll-like receptor 4 (TLR4) e com o aumento nas concentrações intestinais de lipopolissacarídeos (LPS) (KIM, et al. 2012).

O LPS é uma endotoxina presente na membrana celular externa de bactérias gram-negativas que desempenha um papel crucial na ativação de processos inflamatórios, causando uma resposta imune inata (STEPHENS, ARHIRE, COVASA, 2018). Ao interagir com o TLR4, o LPS ativa vias inflamatórias que culminam com o aumento transcrricional do NF Kappa B (NF- κ B) e,

consequentemente, com o aumento na expressão de genes pró-inflamatórios incluindo citocinas e quimiocinas (LAWRENCE, 2009), e de moléculas de adesão como a haptoglobulina que é um marcador de aumento de permeabilidade intestinal (STEPHENS, ARHIRE, COVASA, 2018). Esse aumento na permeabilidade pode alterar os sinais sensoriais enviados ao cérebro e, em conjunto, as alterações induzidas pela dieta na fisiologia da microbiota podem causar inflamação sistêmica de baixo grau no indivíduo, podendo predispor e agravar a obesidade (SANMIGUEL, et al. 2015).

No presente estudo, conjuntamente com redução significativa de peso após a intervenção com dieta hipocalórica, foi observada diminuição significativa da abundância relativa do filo *Proteobacteria* ($p=0,017$). Tal resultado foi semelhante ao encontrado no estudo de Fei e Zhao (2013) que constatou redução da família *Enterobactéria* (pertencente ao filo *Proteobacteria*), após perda de peso de voluntários com obesidade. A diminuição significativa da abundância relativa do filo *Proteobacteria* foi um dos principais achados do presente estudo, visto que é um filo composto por bactérias gram-negativas, que estão associadas a maiores concentrações de intestinais de LPS e de inflamação e, também, com uma maior ingestão de lipídeos (JUNIOR, et al 2017). Assim como foi demonstrado uma correlação positiva entre ingestão de gorduras totais e abundância relativa do filo *Proteobacteria*, a redução na ingestão de gorduras totais e de AG saturados observada no período pós-intervenção, pode estar relacionada com a redução do filo *Proteobacteria*. Ainda, a redução dessas bactérias também pode levar, em conjunto com a perda de peso, a uma menor inflamação, com consequentes melhoras metabólicas.

Além desses fatores, é importante ressaltar que a proporção de AG ômega 6 na dieta tem sido reconhecida como uma importante influência na patogênese da inflamação, pois os derivados desses AG podem iniciar e exacerbar respostas inflamatórias. A ligação entre os AG ômega 6 na dieta e inflamação é parcialmente devida a mudanças no conteúdo desses nos fosfolipídios das membranas de células envolvidas na resposta inflamatória, como monócitos, macrófagos e células endoteliais vasculares (DE MELLO et al. 2012). Sendo que a incorporação do ácido araquidônico (AA, C20: 4), um derivado do AG ômega 6, nos fosfolipídios nas membranas celulares contribui para o aumento da inflamação, além de ser precursor para a síntese das prostaglandinas E2 (PGE2), leucotrienos B4 (LTB4),

os quais são importantes eicosanoides pró-inflamatórios, e a tromboxana A2 (TXA2), potente vasoconstritor e agregador plaquetário (RAPHAEL & SORDILLO, 2013).

Em adição, é demonstrado na literatura que a ingestão de dietas ricas em AG ômega 6 contribuem para o aumento de bactérias do tipo *Enterobacteria*, família que está presente no filo *Proteobacteria* (Mujico et al. 2018; Vaughn, et al 2017). No presente estudo foi demonstrado uma correlação positiva ($r=0,669$; $p=0,049$), entre ingestão de AG ômega 6 com a abundância relativa do filo *Proteobacteria*, demonstrando uma possível relação entre eles. Além disso, é importante ressaltar que a intervenção dietética contribuiu para uma redução da ingestão de AG ômega 6, que pode estar relacionada com a redução da abundância relativa do filo *Proteobacteria*.

Na análise entre o grupo de mulheres eutróficas e mulheres com obesidade pré e pós intervenção, a abundância relativa do filo *Proteobacteria* foi maior nas mulheres eutróficas. Uma possível hipótese para esse achado, é a maior ingestão de gordura saturada do GC quando comparada ao GI pré e GI pós, visto que tal filo é associado a esse tipo de nutriente (BLEAU, et al. 2014).

A abundância relativa do filo *Verrucomicrobia* não foi alterada pela intervenção com dieta hipocalórica. Porém, ao comparar mulheres eutróficas e com obesidade pré e pós intervenção, a abundância relativa desse filo foi maior em mulheres eutróficas, corroborando com o estudo de Zhang et al., 2009. Tal proporção elevada do filo *Verrucomicrobia* em mulheres eutróficas, pode ter sido um fator protetor contra a maior abundância do filo *Proteobacterias* (associado à inflamação), já que evidências sugerem que esse filo *Verrucomirobia* está associado a proteção da barreira intestinal, por aumentar a espessura do muco que reveste o epitélio intestinal, propiciando maior resistência e maior proteção contra inflamações (EVERARD et al. 2013).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com os achados do presente estudo é possível concluir:

- ✓ Mulheres com obesidade apresentam maior valores das variáveis antropométricas, composição corporal, taxa metabólica de repouso, maior oxidação de lipídios e dados bioquímicos com exceção do HDL. Porém, menores valores em relação Kcal/ kg;
- ✓ A ingestão alimentar de mulheres com obesidade é conflitante em relação aos seus dados antropométricos, indicando o sub relato dessas pacientes;
- ✓ A intervenção dietética hipocalórica com redução de 30% do valor energético total em relação ao gasto energético é eficaz na redução de peso, IMC e gordura corpórea e das concentrações séricas de TG;
- ✓ Existe diferenças na composição da microbiota intestinal entre mulheres eutróficas e mulheres com obesidade, sendo que os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actineobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* estão em maior abundância em mulheres eutróficas;
- ✓ A intervenção com dieta hipocalórica é capaz de modular a microbiota intestinal, contribuindo para a redução da abundância do filo *Proteobacteria*;
- ✓ Nutrientes específicos (lipídios, fibras, proteínas e carboidrato) apresentaram correlação com diferentes microorganismos da microbiota intestinal.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, M.; JONKERS, D. M.; TROOST, F. J.; ROESELERS, G.; VENEMA, K. In vitro characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. **Plos one**, v.9, n.11, p.e113864, 2014.

BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A; et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci*, v.101, n.44, p. 15718-23, 2004.

BARLOW, G. M.; YU, A.; MATHUR, R. Role of the gut microbiome in obesity and diabetes mellitus. **Nutr Clin Pract**, v. 30, p.787-797, 2015.

BELZER, C.; AND DE VOS, W. M. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. **ISMEJ**, v.6, p.1449-1458, 2012.

BIN, P.; LIU, S.; CHEN, S.; ZENG, Z.; HUANG, R.; YIN, Y.; et al. The effect of aspartate supplementation on the microbial composition and innate immunity on mice. **Amino Acids**, v.49, n.12, p.2045-2051, 2017.

BLEAU, C.; KARELIS, A. D.; ST-PIERRE, D. H. LAMONTAGNE, L. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low grade inflammation and the development of obesity and diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v.31, n.6, p.545-561, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL). Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/02/vigitel-brasil-2016.pdf> acesso em setembro de 2017.

BRENNER, D. J.; STALEY, J.T.; KRIEG, N. R. Classification of Procaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. **Bergey's Manual of System Bacteriol**, v.2, p.304, 2005.

BROWNING, G.M.; FRANCO, R. L.; CYRUS, J. C.; CELI, F.; EVANS, R. K.; et al. Changes in Resting Energy Expenditure in Relation to Body Weight and

Composition Following Gastric Restriction: A Systematic Review. **Obes Surg**, v.26, p.1607-1615, 2016.

Bueno, N. B.; DE MELO, I. S.; DE OLIVEIRA, S. L.; DA ROCHA, ATAIDE T.; et al. Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Br J Nutr**, v.110, p.1178-1187, 2013.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M.; AMAR, J.; BURCELIN, R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. **Pathol Biol**, v.56, p.305-309, 2008.

CARMENKE, S.; FREITAG, M. H.; PISCHON, T.; SCHLATTMANN, P.; FANKHAENEL, T.; GOEBEL, H.; et al. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. **Eur J Clin Nutr**, v.67, n.6, p. 573-585, 2013.

CARVALHO, K. M. B.; DUTRA, E. S. Obesidade. In: CUPPARI, L. Guia de Nutrição Clínica no adulto. 3 ed. Manole. Barueri, SP. 2014.

CARVALHO, M. C.; MARTINS, A. A obesidade como objeto complexo: uma abordagem filosófico-conceitual. **Ciência Saúde Col**, v.9, p.1003-1012, 2004.

CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nat Rev Genet**, v.13, n.4, p.260-270, 2012.

CODELLA, R.; LUZI, L.; TERRUZI, I. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Dig Liver Dis**, v.50, n.4, p.331-341, 2018.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial Community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v.18, n.5960, p.1694-1697, 2009.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v.3, n.3, p.207-215, 2015.

DEGNAN, H.P.; TAGA, M. E.; GOODMAN, A. L. Vitamin B12 as a modulator of gut microbial ecology. **Cell Metab**, v.20, n.5, p.769-778, 2014.

DOMINIANNI, C.; SINHA, R.; GOEDERT, J. J.; PEI, Z., YANG, L.; HAYES, R. B.; et al. Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. **PLoS One**, v.10, n.4, p.e0124599, 2015.

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

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.; BINDELS, L.; et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci**, v.110, n.22, p.9066-9071, 2013.

FEI, N.; ZHAO, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human cause's obesity in germfree mice. **ISME J**, vol.7, n.4, p.880-884, 2013.

FELIPPE, F.; BALESTRIN, L.; SILVA F. M.; SCHNEIDER, A. P. Qualidade da dieta de indivíduos expostos e não expostos aum programa de reeducação alimentar. **Revista Nutrição**, v.24, n.6, p.833-844, 2011.

FLINT, H. The significance of prokaryote diversity in the human gastrointestinal tract In: LOGAN, N.; LAPPIN-SCOTT, H.; OYSTON, P. (Eds). Prokaryotic diversity: mechanisms and significance. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2006.

FOTHERGILL, E.; GUO, J.; HOWARD, L.; KERNS, J. C.; KNUTH, N. D.; BRYCHTA, R.; et al. Persistent Metabolic Adaptation 6 Years After “The Biggest Loser” Competition. **Obesity (Silver Spring)**, v.24, n.8, p.1612-1619, 2016.

FUJIO-VEJAR, S.; VASQUEZ, Y.; MORALES, P.; MAGNE, F.; VERA-WOLF, P.; UGALDE, J. A.; et al. The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia. **Front. Microbiol**, v.8, p.1221, 2017.

GARCIA-MANTRANA, I.; SELMA-ROYO, M.; ALCANTARA, C.; COLLADO, M. C. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. **Front Microbiol**, v.9, p.890, 2018.

GIMENEZES, J. C.; NICOLETTI, C. F.; DE SOUZA PINHEL, M. A.; DE OLIVEIRA, B. A. P.; SALGADO JÚNIOR, W.; MARCHINI, J. S.; et al. Pregnancy After Roux en Y Gastric Bypass: Nutritional and Biochemical Aspects. **Obes Surg**, v.27, n.7, p.1815–1821, 2017.

GOFFREDO, M.; MASS, K.; PARKS, E. J.; WAGNER, D. A.; MCCLURE, E. A.; GRAF, J.; et al. Role of Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids in Modulating Energy Harvest and Fat Partitioning in Youth. **J Clin Endocrinol Metab**, v.101, n.11, p.4367-4376, 2016.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.361, n.9356, p.512-519, 2003.

GUIMARÃES, N. G.; DUTRA, E. S.; ITO, M. K.; DE CARVALHO, K. M. B. Adesão a um programa de aconselhamento nutricional para adultos com excesso de peso e comorbidades. **Revista Nutrição**, v. 23, n.3, p.323-333, 2010.

GUTIÉRREZ-DÍAZ, I.; FERNÁNDEZ-NAVARRO, T.; SÁNCHEZ, B.; MARGOLLES, A.; GONZÁLEZ, S. Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. **Food Function**, v.7; n.5, p.2347-2356, 2016.

HU, H. J.; PARK, S. G.; JANG, H. B.; CHOI, M. K.; PARK, K. H.; KANG, J. H.; et al. Obesity alters the microbial community profile in Korean adolescents. **PLoS One**, v.10, n.7, p.e0134333, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas – Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014 [acesso em 09 jan 2015]. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>

INELMEN, E. M.; TOFFANELLO, E. D.; ENZI, G.; GASPARINI, G.; MIOTTO, F.; SERGI, G.; et al. Predictors of drop-out in overweight and obese outpatients. **Int J Obes**, v.29, n.1, p.122-128, 2005.

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

JIMÉNEZ JAIME, T.; LEIVA BALICH, L.; BARRERA ACEVEDO, G.; DE LA MAZA CAVE, M. P.; HIRSCH BIRN, S.; HENRÍQUEZ PARADA, S.; et al. Effect of calorie restriction on energy expenditure in overweight and obese adult women. **Nutr Hospit**, v.31, n.6, p.2428-2436, 2015.

JUMPERTZ, R.; JUMPERTZ, R.; LE, D. S.; TURNBAUGH, P. J.; TRINIDAD, C.; BOGARDUS, C.; GORDON, J. I.; et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes caloric load, and nutrient absorption in humans. **Am J Clin Nutr**, v.94, n.1, p.58-65, 2011.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Intern J Mol Sci**, v.15, p.6184-6223, 2014.

KARLSSON, C.L.; ÖNNERFÄLT, J.; XU, J.; MOLIN, G.; ÅHRNÉ, S.; THORNGREN-JERNECK, K. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. **Obesity (Silver Spring)**, v.20, n.11, p.2257-2261, 2012.

KASHTANOVA, D. A.; POPENKO, A. S.; TKACHEVA, O. N.; TYAKHT, A. B.; ALEXEEV, D. G.; BOYTSOV, S. A. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. **Elsevier**, v.32, n.6, p.620-627, 2016.

KIM, K. A.; GU, W.; LEE, I. A.; JOH, E. H.; KIM, D. H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PLoS One**, v.7, n.10, p.e47713, 2012.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.1, n.6, p.a001651, 2009.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effects of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low density and high density lipoproteins cholesterol in health women and men. **N Engl J Med**, v.321, n.7, p.436-441, 1989.

KOCELAK, P.; ZAK-GOŁĄB, A.; ZAHORSKA-MARKIEWICZ, B.; APTEKORZ, M.; ZIENTARA, M.; MARTIROSIAN, G.; et al. Resting energy expenditure and gut microbiota in obese and normal weight subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v.17, n.20, p.2826-2821, 2013.

KOLIADA, A.; SYZENKO, G.; MOSEIKO, V.; BUDOVSKA, L.; PUCHKOV, K.; PEREDERIY, V.; et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, v.17, n.1; p.120, 2017.

KRESTCH, M. J. K.; FONG, A. K. H.; GREEN, M. W. Behavioral and body sizes correlates of energy intake underreporting by obese and normal-weight women. **J Am Diet Assoc**, v.99, n.3, p.300-306, 1999.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G. Y.; LIAO, J.; YANG, C. S.; et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **Am J Clin Nutr**, v.81 (Supplem1), p.284S-291S, 2005.

LEGARREA, P.L. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 23, n.3, p.360-368, 2014.

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; et al. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v.320, n.5883, p.1647-1651, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Elsevier Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MA, N.; TIAN, Y.; WU, Y.; MA, X. Contributions of the Interaction Between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. **Curr Protein Pept Sci**, v.18, n.8, p. 795-808, 2017.

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R.; CUMMINGS, J.H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **J Appl Bacteriol**, v. 72, p.57-64, 1992.

MACFARLANE, S; MACFARLANE, G. Proteolysis and amino fermentation. In: Gibson G, MACFARLANE, G. Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. Boca Raton: **CRC Press**; 1995.

MACHADO, A. B. F. Microbiota intestinal: evidências de sua influência na saúde e na doença. **Rubio**, v.1, p.70-81, 2015.

MARTINS, C.; CUPPARI, L. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar da EPM-UNIFESP: aconselhamento nutricional. **Manole**. 3 Edição, p.151-169, 2014.

MATHUR, R.; BARLOW, G.M. Obesity and the microbiome. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v.9, n.8, p.1087–1099, 2015.

MAYORGA REYES, L.; GONZÁLEZ VÁZQUEZ, R.; CRUZ ARROYO, S. M.; MELENDEZ AVALOS, A.; REYES CASTILLO, P. A.; CHAVARO PÉREZ, D. A.; et al. Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. **Int J Food Sci Nutr**, v.67, n.4, p.470-478, 2016.

MILLION, M.; ANGELAKIS, E.; MARANINCHI, M.; HENRY, M.; GIORGI, R.; VALERO, R.; et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. **Int J Obes**, v.37, n.11, p.1460-1466, 2013.

NICOLETTI, C. F.; LIMA, T. P.; DONADELLI, S. P.; SALGADO, W. JR.; MARCHINI, J. S.; NONINO, C. B. New look at nutrition care for obese patient candidates for bariatric surgery. **Surg Obes Relat Dis**, v.9, n.4, p.520-525, 2011.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO**, v.7, n.7, p.688-693, 2006.

OH, B.; KIM, J. S.; KWEON, M.; KIM, B. S.; HUH, I. S. Six-week Diet Correction for Body Weight Reduction and Its Subsequent Changes of Gut Microbiota: A Case Report. **Clin Nutr**, v.5, n.5, p.137-140, 2016.

OLIVERIA, C.C.; NICOLETTI, C.F.; PINHEL, M.A.S.; et al. Influence of expression of UCP3, PLIN1, PPARG2 on the oxidation of substrates after hypocaloric dietary intervention. **Clinical Nutrition**, 2017.

OSTMAN, C.; SMART, N. A.; MORCOS, D.; DULLER, A.; RIDLEY, W.; JEWISS, D. The effect of exercise training on clinical outcomes in patients with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Cardiovasc Diabetol**, v.16, n.1, p.110, 2017.

PARK, ET AL. Chronically elevated levels of short-chain fatty acids induce T cell-mediated ureteritis and hydronephrosis. **J Immunol**, v.196, n.5, p.2388-2400, 2016.

PAPPAS, P.; KARAOULI, K. Health policy strategies for the treatment of obesity: a systematic review. **Int J Caring Sci**, v.3, n.3, p. 98-105, 2010.

PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutr**, vol.17, n.4, p. 523-533, 2004.

POPKIN, B.M.; KEYOU, G.; ZHAI, F.; GUO, X.; MA, H.; ZHOORI, N. The nutrition transition in China: A cross sectional analysis. **Eur J Clin Nutr**, v.47, n.5, p.333-346, 1993.

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

REIMER, A. R. Inulin-type fructans and whey protein both modulate appetite but only fructans alter gut microbiota in adults with overweight/obesity: A randomized controlled trial. **Mol Nutr Food Res**, v.61, n.11, 2017.

RIBEIRO, A. C.; SÁVIO, K. E. O.; RODRIGUES, M. L. C. F.; COSTA, T. H. M.; SCHIMITZ, B. A. S. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. **Rer Nutr**, vol.19, n. 5, p.553-562, 2006.

RIBEIRO, K. C. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **Sistema de Informação Científica Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal**, 2004.

RIZZATTI, G.; LOPETUSO, L. R.; GIBIINO, G.; BINDA, C.; GASBARRINI, Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed Res Int**, v. 2017, p.9351507, 2017.

SAMPAIO, L. R.; SIMÕES, E. J.; ASSIS, A. M.; RAMOS, L. R. Validity and reliability of the sagittal abdominal diameter as a predictor of visceral abdominal fat. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, p.980-986, 2007

SANTACRUZ, A.; COLLADO, M. C.; GARCÍA-VALDÉS, L.; SEGURA, M. T.; MARTÍN-LAGOS, J. A.; ANJOS, T.; et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **Br J Nutr**, v.104, n.1, p.83-92, 2010.

SANMIGUEL, C.; GUPTA, A.; MAYER, E. A. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. **Current Obesity Reports**, v.4, n.2, p.250-261, 2015.

SANTOS, A. A.; CARVALHO, C. C.; CHAVES, E. C. L.; GOYATA, S. L.T. Qualidade de vida de pessoas com obesidade grau III: um desafio comportamental. **Rer Bras Clin Med**, v.10, n.5, p.384-389, 2012.

SANTOS LAS. Educação alimentar e nutricional no contexto da promoção de práticas alimentares saudáveis. **Rev Nutr**, v.18, n.5, p.681-692, 2005.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. P.; et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v.100, n.1 (Supl.3), 2013.

SANZ, Y.; MOYA-PEREZ, A. Microbiota, inflammation and obesity. **Adv Exp Med Biol**, v.817, p.291-317, 2014.

SCARPELLINI, E.; CAMPANALE, M.; LEONE, D.; PURCHIARONI, F.; VITALE, G.; LAURITANO, E. C.; et al. Gut microbiota and obesity. **Intern Emerg Med**, v.5, (Supplem 1), p.S53-56, 2010.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C.; et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity** (Silver Spring), v.18, n.1, p.190-195, 2010.

SEARS, C. L. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. **Anaerobe**, v.11, p.247-251, 2005.

SEGAN, J.P.; RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE, D.; BOURREILLE, A.; LERAY, V.; GERVOIS, N.; ROSALES, C.; et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v.47, n.3, p.397-403, 2000.

SEKIROV, I. RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev**, v.90, p.859-904, 2010.

SIERVO, M.; FABER, P.; LARA, J.; GIBNEY, E. R.; MILNE, E.; RITZ, P.; et al. Imposed rate and extent of weight loss in obese men 2 and adaptive changes in resting and total energy expenditure. **Elsevier**, 2015.

SILVA-JUNIOR, V. L. S.; LOPES, F. A. M.; ALBANO, R. M.; BARBOSA, C. M. L.; MARANHÃO, P. A.; BOUSKELA, E.; et al. Obesity and gut microbiota - what do we know so far? **Medical Express**, v.4, n.4, p.1-11, 2017.

SINGH, R. K.; CHANG, H.; YAN, D; et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **J Transl Med**, 15:73, 2017.

SIRTORI, C. R.; TREMOLI, E.; GATTI, E.; MONTANARI, G.; SIRTORI, M.; COLLI, S.; et al. Controlled evaluation of fat intake in the mediterranean diet: comparative activities of olive oil and corn oil on plasma lipids and platelets in high risk patients. **Am J Clin Nutr**, v. 44, n. 5, p. 635-642, 1986.

SORGENTE, A.; PIETRABISSA, G.; MANZONI, G. M.; RE, F.; SIMPSON, S.; PERONA, S.; et al. Web-Based Interventions for Weight Loss or Weight Loss Maintenance in Overweight and Obese People: A Systematic Review of Systematic Reviews. **J Med Internet Res**, v.19, n.6, p.e229, 2017.

SWEENEY, T. E.; MORTON, J.M. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. **JAMA Surgery**, v.148, p.563–569, 2013.

TAREN, D.L. TOBAR, M.; HILL, A.; HOWELL, W.; SHISSLAK, C.; BELL, I.; RITENBAUGH, C. The association of energy intake bias with psychological scores of women. **Eur J Clin Nutr**, v. 53, n.7, p.570-578, 1999.

TAUQEER, Z.; GOMEZ, G.; STANFORD, F.C. Obesity in Women: Insights for the Clinician. **J Womens Health**, v.27, n.4, p.444-457, 2018.

TELLES, S.; KALA, N.; SHARMA, S. K.; BALKRISHNA, A.. Anthropometric variables as predictors of aspects of quality of life in persons with central obesity. **BMC ResNotes**, v.11, n.1, p.680. 2018.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v.4, p.457-480, 2009.

VAUGHN, A. C.; COOPER, E. M.; DILORENZO, P. M.; O'LOUGHLIN, L. J.; KONKEL, M. E.; PETERS, J. H.; et al. Energy dense diet triggers changes in gut microbiota, reorganization of gut-brain vagal communication and increases body fat accumulation. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v.77, n.1, p.18-30, 2017.

VENTURA, M; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; et al. All Rights Reserved. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n.3, p. 495–548, 2007.

WALSH, C. J.; GUINANE, C. M.; O'TOOLE, P. W.; COTTER, P. D. BENEFICIAL modulation of the gut microbiota. **FEBS Lett**, v.588, p.4120-4130, 2014.

WIKOFF, W.R.; ANFORA, A. T.; LIU, J.; SCHULTZ, P. G.; LESLEY, S. A.; PETERS, E. C.; SIUZDAK, G. Metabolomics analysis reveals effects of gut

microflora on mammalian blood metabolites. **Proc Natl Acad Sci**, v.106, n.10, p.3698-3703, 2009.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity. **Br J Nutr**, v.104, p.48-66, 2010.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 1998.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y. Y.; KEILBAUGH, S. A.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v.334, n.6052, p.105-108, 2011.

YANAI, H.; KATSUYAMA, H.; HAMASAKI, H.; ABE, S.; TADA, N.; SAKO, A.; et al. Effects of dietary fat intake on HDL metabolism. **J Clin Med Res**, 7(3):145-149, 2015.

YANOVSKI, S. Z. Weight Management in Adults With Obesity: What Is a Primary Care Clinician to Do? **JAMA**, v. 18, p.1111-1113, 2018.

YU, Y.H.; VASSELLI, J. R.; ZHANG, Y.; MECHANICK, J. I.; KORNER, J.; PETERLI, R. Metabolic vs. hedonic obesity: a conceptual distinction and its clinical implications. **Obes Rev**, v.16, p.234-247, 2015.

ZHANG, H.; DIBASE, J. K.; ZUCCOLO, A.; KUDRNA, D.; BRAIDOTTI, M.; YU, Y.; et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric by-pass. **Proc Natl Acad Sci**, v.106, n.7, p.2365-2370, 2009.

Apêndices

APÊNDICE A

**Texto de divulgação fornecido à Assessoria de Imprensa do HCFMRP-USP
para realizar a divulgação do projeto**

Pesquisa seleção de mulheres

Estamos selecionando **mulheres de 18 a 50 anos** com **obesidade grau III** para participar de um estudo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O estudo consiste em um programa utilizando **acompanhamento nutricional** com objetivo de avaliar a **perda de peso**.

Observação: para saber se você se encaixa na pesquisa, calcule seu IMC. Que é seu peso dividido por sua altura ao quadrado.

Exemplo:

Peso: 105 kg/altura: 1,58 m

$$\text{IMC: } \frac{105}{1,58 \times 1,58} = 42,06$$

Se o resultado for maior que 40, você possivelmente poderá participar!

Crêterios: não poderá participar da pesquisa fumante, diabética, gestante e lactante.

Maiores informações e manifestação de interesse pelo email:
pesquisadieta@gmail.com

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes que realizaram intervenção dietética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaria de convidá-la para participar do projeto denominado “O efeito da suplementação de chá verde e dieta hipocalórica na microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III”, sob responsabilidade da aluna de mestrado, Luzania dos Santos Martins e orientação da Prof^a Dr^a Carla Barbosa Nonino. Essa pesquisa irá incluir pacientes magros e também com obesidade com a finalidade de comparar as diferenças da composição da microbiota intestinal. Somente os pacientes com obesidade receberão chá verde em cápsulas durante 8 semanas ou dieta hipocalórica por 8 semanas. Você será incluso no grupo intervenção que receberá orientação de seguir uma dieta hipocalórica caracterizada pela diminuição de 500 kcal do valor energético total (VET) ingerido pela habitualmente. Esta dieta habitual será identificada por meio da investigação do consumo alimentar.

Você foi selecionada a partir dos atendimentos no Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Sua participação consiste na doação de sangue, amostra de fezes, medidas corporais e de consumo alimentar em 2 momentos, no início do estudo e após 8 semanas o acompanhamento nutricional.

O acompanhamento nutricional será semanal. Abaixo detalhamos cada procedimento:

1. Será coletado 20ml de sangue (ou o equivalente a 2 colheres de sopa).
2. Outro item que consiste em sua participação é o fornecimento de amostra de fezes para análise da microbiota intestinal. Serão entregues para tal procedimento um par de luvas, uma espátula coletora, um recipiente coletor

estéril, saco plástico com fecho hermético, caixa isotérmica e será realizada a orientação verbal e entregue impressa em relação ao procedimento de coleta da amostra. Onde deverá higienizar as mãos, colocar as luvas descartáveis, utilizar o coletor estéril e a espátula estéril, evacuar diretamente no coletor, se necessário auxiliar com a espátula. Em seguida fechar o coletor, colocá-lo no plástico e fechá-lo, posicionar o coletor dentro da caixa térmica, acrescentar gelo e fechá-la.

Medidas de peso, altura, circunferência do abdômen. Procedimento indolor e não invasivo.

3. Um exame que verifica sua quantidade de músculo e gordura. Esse exame é chamado Bioimpedância Elétrica, é indolor e não invasivo e realizado com você deitado no leito, com adesivos colados na pele da mão e pé direitos. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum de pelo menos 4 horas. Esse exame tem duração de 3 minutos.

4. Um exame que verifica seu gasto de energia chamado calorimetria indireta. Nesse exame, você ficará deitado e usará um capacete transparente pelo qual medimos a quantidade de oxigênio que está consumindo. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum de pelo menos 8 horas. Esse exame terá duração de 30 minutos. Procedimento indolor e não invasivo.

5. Análise da sua alimentação (todos os alimentos que você consome durante um dia) por meio do questionário chamado de Recordatório 24 horas.

A amostra de sangue e amostra de fezes serão armazenadas no biorrepositório Nutrigenômica e Metabolismo criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, para fins de pesquisas e análises científicas, sob responsabilidade da aluna mestranda Luzania dos Santos Martins da sua orientadora Prof^a Dr^a Carla Barbosa Nonino.

A aluna Luzania dos Santos Martins se compromete a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua doação de sangue serão identificadas por meio de números.

Em decorrência da coleta de sangue poderá ocasionar dor da picada de agulha ou formação de pequenas manchas roxas no local da picada. Com relação à coleta de fezes a participante, eventualmente, poderá sentir-se constrangida em manipular, armazenar e entregar a amostra de fezes ao pesquisador. Com a sua

participação nesta pesquisa você poderá ser beneficiado por ser orientada a seguir uma dieta saudável, podendo obter mudança de hábitos alimentares, redução ponderal e consequente melhora da qualidade de vida. Além disso, estará ajudando a investigação da influência da microbiota intestinal na obesidade. Tal resultado, se positivo, pode ser ferramenta utilizada para otimizar, futuramente, tratamentos de redução de peso.

Sua participação é voluntária, ou seja, você pode recusar a participar desse estudo. Além disso, não terá custo algum, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. Você também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento do estudo.

Você permitirá o acesso dos resultados de exames de sangue contidos no seu prontuário eletrônico e passará informações de contato para podermos lhe encontrar e garantimos fornecer as informações de seu interesse sobre o estudo e possíveis resultados.

Você receberá uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador.

Agradecemos a colaboração, colocando-nos à disposição para qualquer dúvida ou esclarecimentos durante a realização do estudo, você poderá entrar em contato conosco pelo telefone (16) 3602-4810, pelo email luzania_m@yahoo.com.br ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 36022228.

Eu, _____,

RG: _____, _____ anos de idade, concordo com minha participação nesta pesquisa e declaro ter compreendido o termo de consentimento acima sendo minha participação inteiramente voluntária.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Nome por extenso da participante

Assinatura da participante

Nome por extenso do pesquisador

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes do grupo controle.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaria de convidá-la para participar do projeto denominado “O efeito da suplementação de chá verde e dieta hipocalórica na microbiota intestinal em mulheres com obesidade grau III”, sob responsabilidade da aluna de mestrado, Luzania dos Santos Martins e orientação da Prof^a Dr^a Carla Barbosa Nonino. Essa pesquisa irá incluir pacientes magros e também com obesidade com a finalidade de comparar as diferenças da composição da microbiota intestinal. Somente os pacientes com obesidade receberão chá verde em cápsulas durante 8 semanas ou dieta hipocalórica por 8 semanas.

Você foi selecionada a partir dos atendimentos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e caso aceite participar da pesquisa, será incluso no grupo controle (pessoas magras).

Sua participação consiste na doação de 20ml de sangue (ou o equivalente a 2 colheres de sopa) que pode ocasionar dor da picada de agulha ou formação de pequenas manchas roxas no local da picada. Outro item que consiste sua participação é o fornecimento de amostra de fezes para análise da microbiota intestinal. Serão entregues para tal procedimento um par de luvas, uma espátula coletora, um recipiente coletor estéril, saco plástico com fecho hermético, caixa isotérmica e será realizada a orientação verbal e entregue impressa em relação ao procedimento de coleta da amostra. Será orientada que deverá higienizar as mãos, colocar as luvas descartáveis, utilizar o coletor estéril e a espátula estéril, evacuar diretamente no coletor, se necessário auxiliar com a espátula. Em

seguida fechar o coletor, colocá-lo no plástico e fechá-lo, posicionar o coletor dentro da caixa térmica, acrescentar gelo e fechá-la.

Caso você aceite participar da pesquisa, em data agendada deverá comparecer ao Ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, dessa forma serão realizadas as seguintes avaliações:

1-) Medidas de peso, altura, circunferência do abdômen.

2-) Um exame que verifica sua quantidade de músculo e gordura. Esse exame é chamado Bioimpedância Elétrica, é indolor e não invasivo e realizado com você deitado no leito, com adesivos colados na pele da mão e pé direito. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum por pelo menos 4 horas. Esse exame tem duração de 3 minutos.

3-) Um exame que verifica seu gasto de energia chamado calorimetria indireta. Nesse exame, você ficará deitado e usará um capacete transparente pelo qual medimos a quantidade de oxigênio que está consumindo. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum de pelo menos 8 horas. Esse exame terá duração de 30 minutos.

4-) Análise da sua alimentação (todos os alimentos que você consome durante um dia) por meio do questionário chamado de Recordatório 24 horas.

Todas as avaliações serão realizadas em um único momento.

As amostras de sangue e amostras de fezes serão armazenadas no biorrepositório Nutrigenômica e Metabolismo criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, para fins de pesquisas e análises científicas, sob responsabilidade da aluna mestranda Luzania dos Santos Martins e da sua orientadora Prof^a Dr^a Carla Barbosa Nonino.

A aluna Luzania dos Santos Martins se compromete a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua doação de gordura abdominal e sangue serão identificadas por meio de números.

Em decorrência da coleta de sangue poderá ocasionar dor da picada de agulha ou formação de pequenas manchas roxas no local da picada. Com relação à coleta de fezes a participante, eventualmente, poderá sentir-se constrangida em manipular, armazenar e entregar a amostra de fezes ao pesquisador. Com a sua

participação nesta pesquisa, estará ajudando a investigação da influência da microbiota intestinal na obesidade. *Tal resultado, se positivo, pode ser ferramenta utilizada para otimizar, futuramente, tratamentos de redução de peso.*

Sua participação é voluntária, ou seja, você pode recusar a participar desse estudo. Além disso, não terá custo algum, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. A senhora também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento do estudo.

A senhora passará informações de contato para podermos lhe encontrar e garantimos fornecer as informações de seu interesse sobre o estudo e possíveis resultados.

A senhora receberá uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador.

Agradecemos a colaboração, colocando-nos à disposição para qualquer dúvida ou esclarecimentos durante a realização do estudo, você poderá entrar em contato conosco pelo telefone (16) 3602-4810, (16) 992347571 pelo email luzania_m@yahoo.com.br ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 36022228.

Eu, _____,

RG: _____, _____ anos de idade, concordo com minha participação nesta pesquisa e declaro ter compreendido o termo de consentimento acima sendo minha participação inteiramente voluntária.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Nome por extenso da participante

Assinatura da participante

Nome por extenso do pesquisador

Assinatura do pesquisador da equipe

APÊNDICE D

Orientação para coleta de fezes.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Orientação para coleta de fezes.

No Kit de amostra entregue estão presentes: luvas, uma espátula coletora, um recipiente coletor, saco plástico com fecho hermético, caixa isotérmica.

Passos para realizar a coleta:

- 1) Higienizar as mãos;
- 2) Colocar as luvas descartáveis;
- 3) Utilizar o coletor e a espátula, evacuar diretamente no coletor, se necessário auxiliar com a espátula (Atenção: é importante evitar o contato das fezes com urina, água ou outros elementos);
- 4) Em seguida, fechar o coletor, colocar o coletor no plástico com fecho hermético e fechá-lo;
- 5) Posicionar o saco plástico com o coletor dentro da caixa térmica, acrescentar gelo e fechá-la;
- 6) Colocar a caixa térmica com a amostra dentro do congelador até o momento do transporte;

Observação: As fezes devem ser coletadas no dia anterior, ou no mesmo dia (pela manhã) agendado para entrega da amostra (fezes). Lembrar que no momento do transporte da amostra, os gelos devem ser mantidos da caixa de isopor para, dessa forma, manter a temperatura.

Atenção: Não fazer uso de laxativos, prébiótico e próbióticos.

Para dúvidas sobre a coleta, entrar em contato com a pesquisadora responsável

Anexos

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética do HCFMRP-USP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2016.

Ofício nº 3587/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 8982/2016

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CHÁ VERDE E DIETA HIPOCALÓRICA NA MICROBIOTA INTESTINAL EM MULHERES COM OBESIDADE GRAU III" – Projeto de Pesquisa Versão 2 modificado (data: 15/08/2016)**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 439ª Reunião Ordinária realizada em 24/10/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Biorrepositório; os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 modificado data: 15/08/2016 e o Termo de Guarda de Material Biológico Versão 2 modificado data: 15/08/2016.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

LUZANIA DOS SANTOS MARTINS
PROFª DRª CARLA BARBOSA NONINO (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica